

(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2005-532332

(P2005-532332A)

(43) 公表日 平成17年10月27日(2005.10.27)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/00	A 6 1 K 31/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/04	A 6 1 K 31/04	4 C 2 0 6
A 6 1 K 31/122	A 6 1 K 31/122	
A 6 1 K 31/138	A 6 1 K 31/138	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 103 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-506824 (P2004-506824)	(71) 出願人	504274712
(86) (22) 出願日	平成15年5月15日 (2003. 5. 15)		ゼンサン (シャンハイ) サイエンス
(85) 翻訳文提出日	平成17年1月24日 (2005. 1. 24)		アンド テクノロジー リミテッド
(86) 国際出願番号	PCT/CN2003/000355		中華人民共和国 シャンハイ 20120
(87) 国際公開番号	W02003/099300		3, ザンジャン ハイテック パーク
(87) 国際公開日	平成15年12月4日 (2003. 12. 4)		, ビボ ロード シー-2/328
(31) 優先権主張番号	PCT/CN02/00349	(74) 代理人	100107489
(32) 優先日	平成14年5月24日 (2002. 5. 24)		弁理士 大塩 竹志
(33) 優先権主張国	中国 (CN)	(72) 発明者	ゾウ, ミンドン
			中華人民共和国 シャンハイ 20120
			3, ザンジャン ハイテック パーク
			, ビボ ロード ナンバー328

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心血管疾患を処置するためのニューレギュリン法および組成物

## (57) 【要約】

本発明は、哺乳動物（特に、ヒト）における種々の心血管疾患または障害を予防、処置、または遅延するための組成物および方法に関する。より詳細には、本発明は、とりわけ、ニューレギュリンタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリンタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、またはニューレギュリンの産生および/もしくは機能を増強する薬剤を用いて、種々の心血管疾患または障害を予防、処置、または遅延するための組成物および方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

組み合わせであって、有効量のニューレギュリンタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリンタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、または該ニューレギュリンの産生および/もしくは機能を増強する薬剤、ならびにウイルス性心筋炎もしくは拡張型(うっ血性)心筋症(DCM)のための有効量の予防剤もしくは治療剤を含む、組み合わせ。

## 【請求項 2】

前記ニューレギュリンが、Erbb2 - Erbb4レセプターとの結合を通じて、その抗ウイルス性心筋炎活性または抗DCM活性を発揮する、請求項 1 に記載の組み合わせ。

10

## 【請求項 3】

前記ニューレギュリンが、ニューレギュリン 1、ニューレギュリン 2、ニューレギュリン 3、およびニューレギュリン 4 からなる群より選択される、請求項 1 に記載の組み合わせ。

## 【請求項 4】

前記ニューレギュリン 1 がニューレギュリン 2 またはニューレギュリン 2 である、請求項 3 に記載の組み合わせ。

## 【請求項 5】

前記ニューレギュリンフラグメントが、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含むニューレギュリン 2 フラグメントである、請求項 1 に記載の組み合わせ。

20

## 【請求項 6】

前記ウイルス性心筋炎のための予防剤または治療剤が、抗生物質、心臓保護剤、抗酸化剤、および心筋栄養剤からなる群より選択される、請求項 1 に記載の組み合わせ。

## 【請求項 7】

前記抗生物質がペニシリンである、請求項 6 に記載の組み合わせ。

## 【請求項 8】

前記心臓保護剤がタウリンである、請求項 6 に記載の組み合わせ。

## 【請求項 9】

前記抗酸化剤が、ビタミン C、ビタミン E、およびコエンザイム Q10 からなる群より選択される、請求項 6 に記載の組み合わせ。

30

## 【請求項 10】

前記心筋栄養剤がエネルギーの組み合わせである、請求項 6 に記載の組み合わせ。

## 【請求項 11】

前記 DCM のための予防剤または治療剤が、心臓強壮剤、利尿剤、アンジオテンシン I 変換酵素インヒビター(ACEI)、カルシウムアンタゴニスト、および  $\beta$ -レセプターアンタゴニストからなる群より選択される、請求項 1 に記載の組み合わせ。

## 【請求項 12】

前記心臓強壮剤がジゴキシンまたはセジラニドである、請求項 11 に記載の組み合わせ。

## 【請求項 13】

前記利尿剤が、炭酸脱水素酵素インヒビター、浸透圧利尿剤、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  シンポートインヒビター、 $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$  シンポートインヒビター、腎臓上皮  $\text{Na}^+$  チャネルインヒビター、および鉍質コルチコイドレセプターアンタゴニストからなる群より選択される、請求項 11 に記載の組み合わせ。

40

## 【請求項 14】

前記カルシウムアンタゴニストがアムロジピンである、請求項 11 に記載の組み合わせ。

## 【請求項 15】

前記  $\beta$ -レセプターアンタゴニストがカルベジロールである、請求項 11 に記載の組み合わせ。

## 【請求項 16】

薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤をさらに含む、請求項 1 に記載の組み合わせ。

50

## 【請求項 17】

キットであって、容器中の請求項 1 に記載の組み合わせ、および該組み合わせを用いてウイルス性心筋炎または DCM を予防、処置、または遅延するための指示書を備える、キット。

## 【請求項 18】

哺乳動物におけるウイルス性心筋炎または拡張型（うっ血性）心筋症（DCM）を予防、処置、または遅延するための方法であって、このような予防、処置、または遅延が必要とされるかまたは望ましい哺乳動物に、有効量のニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、または該ニューレギュリンの産生および/もしくは機能を増強する薬剤を投与する工程を包含し、それによって、該ウイルス性心筋炎または DCM が予防、処置、または遅延される、方法。

10

## 【請求項 19】

前記ニューレギュリンが、ErbB2 - ErbB4 レセプターとの結合を通じて、その抗ウイルス性心筋炎活性または抗 DCM 活性を発揮する、請求項 18 に記載の方法。

## 【請求項 20】

前記ニューレギュリンが、ニューレギュリン 1、ニューレギュリン 2、ニューレギュリン 3、およびニューレギュリン 4 からなる群より選択される、請求項 18 に記載の方法。

## 【請求項 21】

前記ニューレギュリン 1 がニューレギュリン 2 またはニューレギュリン 2 である、請求項 20 に記載の方法。

20

## 【請求項 22】

前記ニューレギュリンフラグメントが、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含むニューレギュリン 2 フラグメントである、請求項 18 に記載の方法。

## 【請求項 23】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 18 に記載の方法。

## 【請求項 24】

前記ウイルス性心筋炎が、Coxsackie Group A ウイルス、Coxsackie Group B ウイルス、ECHO ウイルス、およびポリオウイルスからなる群より選択されるウイルスの感染により引き起こされるかまたは該ウイルスの感染に付随する、請求項 18 に記載の方法。

30

## 【請求項 25】

前記ウイルス性心筋炎が、Coxsackie Group B ウイルスの感染により引き起こされるかまたは該ウイルスの感染に付随する、請求項 18 に記載の方法。

## 【請求項 26】

前記ウイルス性心筋炎が、心外膜炎または心内膜炎を併発する、請求項 18 に記載の方法。

## 【請求項 27】

前記ウイルス性心筋炎が、心筋の損傷、心臓機能障害、不整脈、全身性症候群、および心筋症からなる群より選択される臨床的特長を有する、請求項 18 に記載の方法。

40

## 【請求項 28】

前記ウイルス性心筋炎が、急性または慢性のウイルス性心筋炎である、請求項 18 に記載の方法。

## 【請求項 29】

前記ウイルス性心筋炎が、不整脈、心不全、および心臓ショックからなる群より選択される臨床的特長を有する、請求項 28 に記載の方法。

## 【請求項 30】

前記ウイルス性心筋炎が、心臓肥大および/または永久心筋損傷により長期化する、請求項 18 に記載の方法。

## 【請求項 31】

50

前記 D C M が、心室肥大、心筋ポンプ機能不全、およびうっ血性心不全からなる群より選択される臨床的特長を有する、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 32】

前記ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸が、薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤と共に投与される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 33】

ニューレギュリタンパク質またはその機能的フラグメントが投与される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 34】

ニューレギュリタンパク質またはその機能的フラグメントをコードする核酸が投与される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 35】

ウイルス性心筋炎または D C M のための予防剤または治療剤を投与する工程をさらに包含する、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 36】

前記ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸が、前記ウイルス性心筋炎または D C M のための予防剤または治療剤の投与の前、同時、またはその後に投与される、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記ウイルス性心筋炎のための予防剤または治療剤が、抗生物質、心臓保護剤、抗酸化剤、および心筋栄養剤からなる群より選択される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 38】

前記抗生物質がペニシリンである、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記心臓保護剤がタウリンである、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 40】

前記抗酸化剤が、ビタミン C、ビタミン E、およびコエンザイム Q10 からなる群より選択される、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 41】

前記心筋栄養剤がエネルギーの組み合わせである、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 42】

前記 D C M のための予防剤または治療剤が、心臓強壮剤、利尿剤、アンギオテンシン I 変換酵素インヒビター (ACEI)、カルシウムアンタゴニスト、および  $\beta$ -レセプターアンタゴニストからなる群より選択される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 43】

前記心臓強壮剤がジゴキシンまたはセジラニドである、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

前記利尿剤が、炭酸脱水素酵素インヒビター、浸透圧利尿剤、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  シンポートインヒビター、 $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$  シンポートインヒビター、腎臓上皮  $\text{Na}^+$  チャネルインヒビター、および鉍質コルチコイドレセプターアンタゴニストからなる群より選択される、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 45】

前記カルシウムアンタゴニストがアムロジピンである、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 46】

前記  $\beta$ -レセプターアンタゴニストがカルベジロールである、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 47】

哺乳動物におけるウイルス性心筋炎または拡張型 (うっ血性) 心筋症 (D C M) を予防、処置、または遅延するための薬学的組成物であって、有効量のニューレギュリタンパク

10

20

30

40

50

質もしくはその機能的フラグメント、またはNRGタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、または該ニューレギュリンの産生および/もしくは機能を増強する薬剤を含む、薬学的組成物。

【請求項48】

前記ニューレギュリンが、ErbB2-ErbB4レセプターとの結合を通じて、その抗ウイルス性心筋炎活性または抗DCM活性を発揮する、請求項47に記載の薬学的組成物。

【請求項49】

前記ニューレギュリンが、ニューレギュリン1、ニューレギュリン2、ニューレギュリン3、およびニューレギュリン4からなる群より選択される、請求項47に記載の薬学的組成物。

10

【請求項50】

前記ニューレギュリン2がニューレギュリン2またはニューレギュリン2である、請求項49に記載の薬学的組成物。

【請求項51】

前記ニューレギュリンフラグメントが、配列番号4に示されるアミノ酸配列を含むニューレギュリン2フラグメントである、請求項47に記載の薬学的組成物。

【請求項52】

前記ニューレギュリントタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリントタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸が、約25 $\mu$ g~約2

20

500 $\mu$ gの用量範囲を有する、請求項47に記載の薬学的組成物。

【請求項53】

キットであって、容器中の請求項47に記載の薬学的組成物、および該組成物を用いてウイルス性心筋炎またはDCMを予防、処置、または遅延するための指示書を備える、キット。

【請求項54】

その予防、処置、または遅延が必要とされるかまたは望ましい哺乳動物における心臓毒性を予防、処置、または遅延するための方法であって、インピボで哺乳動物に、有効量の予防剤または治療剤、および有効量の(i)ニューレギュリントタンパク質もしくはその機能的フラグメント；(ii)ニューレギュリントタンパク質もしくはその機能的フラグメント

30

をコードする核酸；または(iii)該ニューレギュリンの産生もしくは機能を増強する薬剤を投与する工程を包含し、それによって、該予防剤または治療剤の投与に伴う心臓毒性が予防、処置、または遅延される、方法。

【請求項55】

前記予防剤または治療剤が、前記心臓毒性を引き起こす酸素由来のフリーラジカルを産生する、請求項54に記載の方法。

【請求項56】

前記予防剤または治療剤が、前記心臓毒性を引き起こす脂質可酸化を増強する、請求項54に記載の方法。

40

【請求項57】

前記予防、処置、または遅延される心臓毒性が、頻拍、不整脈、およびうっ血性心不全からなる群より選択される、請求項54に記載の方法。

【請求項58】

前記急性心臓毒性が、洞頻拍、不整脈、伝導ブロック、およびST-Tセグメントの変質からなる群より選択される臨床的特長を有する、請求項58に記載の方法。

【請求項60】

前記慢性心臓毒性が、不可逆的なうっ血性心不全の臨床的特長を有する、請求項58に記

50

載の方法。

【請求項 6 1】

前記予防、処置、または遅延される心臓毒性が、左心室駆出フラクシオン ( L V E F ) の減少、一回拍出量 ( S V ) の減少、心拍出量 ( C O ) の減少、または心係数 ( C I ) の減少を含む、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記予防、処置、または遅延される心臓毒性が、左心室の収縮およびポンプ能力の阻害を含む、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記予防剤または治療剤が、抗新生物剤、抗精神病剤、三環系抗うつ剤、インターフェロン、インターロイキン、および抗感染剤からなる群より選択される、請求項 5 4 に記載の方法。

10

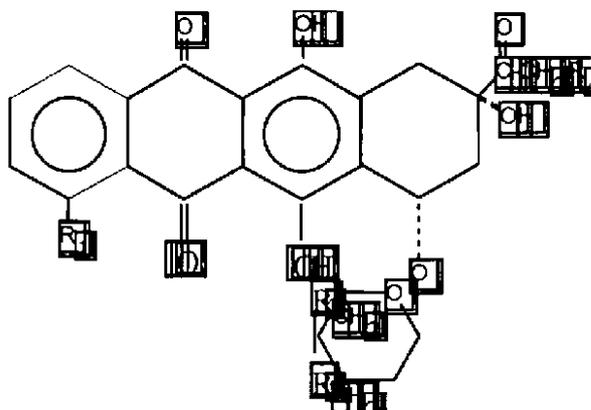
【請求項 6 4】

前記抗新生物剤がアントラサイクリン抗新生物剤である、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記アントラサイクリン抗新生物剤が、以下の式 I :

【化 1】



20

30

を有し、ここで、R 1 はメトキシまたは水素であり ; ならびに R 2 、 R 3 、 および R 4 は、ヒドロキシまたは水素である、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記アントラサイクリン抗新生物剤が、アドリアマイシン ( またはドキシソルピシン ) 、ダウノルピシン、エピルピシン、イダルピシン、ミトキサントロン、マイトマイシン、プレオマシイン、シクロホフファミド、フルオロウラシル、アクチノマイシン D 、 およびピンクリスチンからなる群より選択される、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記アントラサイクリン抗新生物剤がアドリアマイシンである、請求項 6 6 に記載の方法。

40

【請求項 6 8】

前記抗精神病剤が、クロルプロマジン、パーフェナジン、またはトリフルペラジンからなる群より選択される、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記三環系抗うつ剤が、クロリミプラミン、アミトリプチリン、およびドキシセピンからなる群より選択される、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記インターフェロンがインターフェロン - である、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 7 1】

50

前記インターロイキンがインターロイキン - 2 である、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記抗感染剤がエメチンである、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記ニューレギュリンが、ニューレギュリン 1、ニューレギュリン 2、ニューレギュリン 3、およびニューレギュリン 4 からなる群より選択される、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記ニューレギュリン 1 がニューレギュリン 2 またはニューレギュリン 2 である、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記ニューレギュリンフラグメントが、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含むニューレギュリン 2 である、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、または該ニューレギュリンの産生または機能を増強する薬剤が、薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤と共に投与される、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 7 7】

ニューレギュリタンパク質またはその機能的フラグメントが投与される、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

ニューレギュリタンパク質またはその機能的フラグメントをコードする核酸が投与される、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、または該ニューレギュリンの産生または機能を増強する薬剤が、予防剤または治療剤の投与の前、同時、またはその後に投与される、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記予防剤または治療剤は、該予防剤または治療剤が、ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、または該ニューレギュリンの産生もしくは機能を増強する薬剤の非存在下で投与される場合に最大限許容される量よりも高い量で投与される、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記ヒトが、肺癌、乳癌、膀胱癌、精巣癌、甲状腺癌、柔組織癌、骨肉腫、神経芽腫、急性白血病、悪性リンパ腫、胃癌、肝臓癌、食道癌、および頸部癌からなる群より選択される悪性腫瘍を有する、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】

組み合わせであって、有効量のニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、または該ニューレギュリンの産生および/もしくは機能を増強する薬剤、ならびに心筋梗塞のための有効量の予防剤もしくは治療剤を含む、組み合わせ。

【請求項 8 4】

前記ニューレギュリンが、E r b B 2 - E r b B 4 レセプターとの結合を通じて、その抗心筋梗塞活性を発揮する、請求項 8 3 に記載の組み合わせ。

【請求項 8 5】

前記ニューレギュリンが、ニューレギュリン 1、ニューレギュリン 2、ニューレギュリン

10

20

30

40

50

3、およびニューレギュリン4からなる群より選択される、請求項83に記載の組み合わせ。

【請求項86】

前記ニューレギュリン1がニューレギュリン2またはニューレギュリン2である、請求項85に記載の組み合わせ。

【請求項87】

前記ニューレギュリンフラグメントが、配列番号4に示されるアミノ酸配列を含むニューレギュリン2フラグメントである、請求項83に記載の組み合わせ。

【請求項88】

前記ウイルス性心筋炎の予防剤または治療剤が、アンジオテンシンI変換酵素インヒビター(ACEI)、カルシウムアンタゴニスト、 $\beta$ -レセプターアンタゴニスト、アスピリン、アトロピン、ニトログリセリン、スコポールアミン、および血栓崩壊剤からなる群より選択される、請求項83に記載の組み合わせ。 10

【請求項89】

前記ACEIが、カプトプリル、ラムプリル、リシノプリル、ゾフェノプリル、およびトランドラプリルからなる群より選択される、請求項88に記載の組み合わせ。

【請求項90】

前記カルシウムアンタゴニストがジルチアゼムである、請求項88に記載の組み合わせ。

【請求項91】

前記 $\beta$ -レセプターアンタゴニストがプロパノールオール、メトプロロール、アテノールオール、およびチモールオールからなる群より選択される、請求項88に記載の組み合わせ。 20

【請求項92】

前記血栓崩壊剤が、ストレプトキナーゼ、t-PA、およびアニストレプラーゼからなる群より選択される、請求項88に記載の組み合わせ。

【請求項93】

薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤をさらに含む、請求項83に記載の組み合わせ。

【請求項94】

キットであって、容器中の請求項83に記載の組み合わせ、および該組み合わせを用いて心筋梗塞を予防、処置、または遅延するための指示書を備える、キット。 30

【請求項95】

哺乳動物における心筋梗塞を予防、処置、または遅延するための方法であって、このような予防、処置、または遅延が必要とされるかまたは望ましい哺乳動物に、有効量のニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、または該ニューレギュリンの産生および/もしくは機能を増強する薬剤を投与する工程を包含し、それによって、該心筋梗塞が予防、処置、または遅延される、方法。

【請求項96】

前記ニューレギュリンが、Erbb2-Erbb4レセプターとの結合を通じて、その抗心筋梗塞活性を発揮する、請求項95に記載の方法。 40

【請求項97】

前記ニューレギュリンが、ニューレギュリン1、ニューレギュリン2、ニューレギュリン3、およびニューレギュリン4からなる群より選択される、請求項95に記載の方法。

【請求項98】

前記ニューレギュリン1がニューレギュリン2またはニューレギュリン2である、請求項97に記載の方法。

【請求項99】

前記ニューレギュリンフラグメントが、配列番号4に示されるアミノ酸配列を含むニューレギュリン2フラグメントである、請求項95に記載の方法。 50

## 【請求項 100】

前記ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、または該ニューレギュリタンの産生および/もしくは機能を増強する薬剤が、前記心筋梗塞に付随する左心室拡張終期 (LVEDD) および収縮末期直径 (LVESD) の増加をアンタゴナイズする、請求項 95 に記載の方法。

## 【請求項 101】

前記ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、または該ニューレギュリタンの産生および/もしくは機能を増強する薬剤が、前記心筋梗塞に伴う左心室 EF の減少をアンタゴナイズする、請求項 95 に記載の方法。

10

## 【請求項 102】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 95 に記載の方法。

## 【請求項 103】

前記心筋梗塞が、左心室拡張、減少した収縮機能、および増加した充填圧からなる群より選択される臨床的特長を有する、請求項 95 に記載の方法。

## 【請求項 104】

前記ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸または該ニューレギュリタンの産生および/もしくは機能を増強する薬剤が、薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤と共に投与される、請求項 95 に記載の方法。

20

## 【請求項 105】

ニューレギュリタンパク質またはその機能的フラグメントが投与される、請求項 95 に記載の方法。

## 【請求項 106】

ニューレギュリタンパク質またはその機能的フラグメントをコードする核酸が投与される、請求項 95 に記載の方法。

## 【請求項 107】

心筋梗塞のための予防剤または治療剤を投与する工程をさらに包含する、請求項 95 に記載の方法。

30

## 【請求項 108】

前記ウイルス性心筋炎の予防剤または治療剤が、アンギオテンシン I 変換酵素インヒビター (ACEI)、カルシウムアンタゴニスト、 $\beta$ -レセプターアンタゴニスト、アスピリン、アトロピン、ニトログリセリン、スコポールアミン、および血栓崩壊剤からなる群より選択される、請求項 107 に記載の方法。

## 【請求項 109】

前記 ACEI が、カプトプリル、ラムプリル、リシノプリル、ゾフェノプリル、およびトランドラプリルからなる群より選択される、請求項 108 に記載の方法。

## 【請求項 110】

前記カルシウムアンタゴニストがジルチアゼムである、請求項 108 に記載の方法。

40

## 【請求項 111】

前記  $\beta$ -レセプターアンタゴニストがプロパノールオール、メトプロロール、アテノールオール、およびチモールオールからなる群より選択される、請求項 108 に記載の方法。

## 【請求項 112】

前記血栓崩壊剤が、ストレプトキナーゼ、t-PA、およびアニストレプラーゼからなる群より選択される、請求項 108 に記載の方法。

## 【請求項 113】

前記ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸または該ニューレギュリタンの産生および/もしくは機能を増強する薬剤が、インビボで投与される、請求項 95

50

に記載の方法。

【請求項 1 1 4】

哺乳動物における疾患を予防、処置、または遅延するための薬学的組成物であって、ニューレギュリタンパク質またはその機能的フラグメントを：

( a ) 約 1 7 0 U / k g 以下の安全用量で；または

( b ) 約 3 , 6 0 0 U / k g 以下の総レジメンで、

含む、薬学的組成物。

【請求項 1 1 5】

約 2 1 日または約 2 1 日未満で投与される、請求項 1 1 4 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 1 6】

連続的にまたは間欠的に投与される、請求項 1 1 4 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 1 7】

薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤をさらに含む、請求項 1 1 4 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 1 8】

前記ニューレギュリンが、E r b B 2 - E r b B 4 レセプターとの結合を通じて、その抗疾患活性を発揮する、請求項 1 1 4 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 1 9】

前記ニューレギュリンが、ニューレギュリン 1、ニューレギュリン 2、ニューレギュリン 3、およびニューレギュリン 4 からなる群より選択される、請求項 1 1 4 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 2 0】

前記ニューレギュリン 1 がニューレギュリン 2 またはニューレギュリン 2 である、請求項 1 1 9 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 2 1】

前記ニューレギュリンフラグメントが、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含むニューレギュリン 2 フラグメントである、請求項 1 2 0 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 2 2】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 1 1 9 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 2 3】

前記疾患が心血管疾患である、請求項 1 1 4 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 2 4】

静脈内投与のために処方されている、請求項 1 1 4 に記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本願は、P C T / C N 0 2 / 0 0 3 4 9 ( 2 0 0 2 年 5 月 2 4 日出願 )、P C T / C N 0 2 / 0 0 6 6 4 ( 2 0 0 2 年 9 月 1 8 日出願 )、中国特許出願第 0 2 1 4 5 1 4 5 . 1 号 ( 2 0 0 2 年 1 1 月 8 日出願 )、および中国特許出願第 0 3 1 0 9 9 7 6 . 9 号 ( 2 0 0 3 年 4 月 9 日出願 ) に関連する。上記出願の開示は、その全体が本明細書中に参考として援用されている。

【0 0 0 2】

( 技術分野 )

本発明は、哺乳動物 ( 特に、ヒト ) における種々の心血管疾患または障害を予防、処置、または遅延するための組成物および方法に関する。より詳細には、本発明は、とりわけ、ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、または該ニューレギュリンの産生および / もしくは機能を増強する薬剤を用いて、種々の心血管疾患または障害を予防、処置、または遅延するための組成物および方法を提供する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

## 【0003】

(背景技術)

ウイルス性心筋炎は、間質性心筋層における局所性または散在性の炎症の滲出および心筋線維の分解、壊死、または溶解を誘導する種々のウイルスにより引き起こされるかまたはそれらに関連する心筋の炎症である。ウイルス性心筋炎は、心外膜炎または心内膜炎により併発され得る。ウイルス性心筋炎の結果は、心筋の損傷、心臓の機能不全、不整脈、および全身性症候群を誘導する。ウイルス性心筋炎は、全ての年齢で起こる。近年、ウイルス性心筋炎の発生率が増加している。急性ウイルス性心筋炎の後遺症としては、不整脈、心不全、心臓ショックが、および突然死さえも挙げられる。この疾患は、心臓肥大および永久心筋損傷により長期化され得る。心筋症は、最終的には、免疫反応から生じる。ウイルス性心筋炎の処置としては、抗生物質、心臓保護剤、抗酸化剤（例えば、高用量のビタミンC、ビタミンE、コエンザイムQ10）、心筋用栄養剤（例えば、心筋に十分な栄養を提供するエネルギーの組み合わせ）が挙げられる。これらの測定は、心臓の機能を改善するため、心臓の損傷を修復するため、および心不全を予防するために適用されるが、その効果は理想的ではない（特に、心筋炎における構造的および機能的変化について）。これらの病的変化に対して信頼できる治療法は存在しない。

10

## 【0004】

拡張型（うっ血性）心筋症（DCM）は、起源の同定されていない種々の心筋疾患の最終的な結果である。その病理的变化は、非リウマチ性、非高血圧性であり、冠動脈心臓疾患に起因しない。拡張型心筋症の主要な臨床的特徴は、心室肥大、心筋ポンプ機能不全、またはうっ血性心不全である。核およびオルガネラの肥大は、一般的に、拡張型心筋症の穏やかな心筋の損傷において見られる。構造的変化、細胞死、および結果として起こる線維症は、通常、重篤な損傷において見られる。DCMの病因論および病原論は、はっきりしている。DCMの予後は、効果的な治療法がないため、非常に乏しい。このような患者のほとんどは、徐々に悪化する心不全により死亡する。突然死が、不整脈から起こり得る。現在、DCMに対して特に効果的な治療法は存在しない。DCMの慣用的な処置としては、心臓強壮剤、利尿剤、ACEI、および他の薬物の投与が挙げられる。さらに、第三世代のカルシウムアンタゴニストであるアムロジピンおよび第三世代の - レセプターアンタゴニスト（例えば、カルベジロール）はまた、DCMを処置するために使用される。甲状腺ホルモンおよび成長ホルモンの効果については議論の余地がある。なぜならば、無作為化された二重盲目臨床試験の証拠が利用可能でないからである。左心室の容積減少手術は、左心室の内部直径を減少させ、心臓機能を一時的に改善し得る。しかし、手術後の心不全および不整脈に関連する死亡率がより高くなることから、この方法の適用を妨げている。動的骨格筋ポンプ（dynamic cardiomyolasty）は、心臓機能を改善するのに有用であるが、患者は、比較的広い外傷に耐え得ることができない。従って、この手術は、心臓移植の代替としてのみ使用される。手術の中で、心臓移植は急進的なDCM処置である。しかし、ドナーの心臓がないこと、費用が高いこと、術後感染、および移植片拒絶が、主な障害である。従って、臨床実務において、新規のDCM治療が緊急に必要とされている。

20

30

## 【0005】

ドキソルビシンまたはアドリアマイシン（ADM）は、広範なスペクトルおよび強い抗腫瘍活性を有するアントラサイクリン抗癌剤に属する。臨床実務においては、種々の悪性腫瘍（例えば、肺癌、乳癌、膀胱癌、精巣癌、甲状腺癌、柔組織癌、骨肉腫、神経芽腫、急性白血病、悪性リンパ腫、胃癌、肝臓癌、食道癌、および頸部癌）を処置するために広く使用されている。ADMは、DNAとの結合を通じて、DNA合成を阻害するよう作用する。その阻害効果は、S期、M期、G1期、およびG2期に観察されるが、その活性は、S期で最も活性である。乳癌患者に対する単独時間（unit time）において、転移性化学療法であろうと術後化学療法であろうと、化学療法剤が高用量であるほど、より良好な臨床的效果およびより長期の生存性をもたらすことが発見された。他の研究は、より高い用量および用量能の重要性、ならびに用量、用量能、および効果の間の関連性を

40

50

確認した。

【0006】

しかし、ADMの適用は、その毒性の副作用により制限されている。ADMの毒性としては、骨髄の沈下が挙げられる。約60～80%の患者において、白血球数および血小板数は、投与10～15日後に最低レベルに低下し、そして21日後に正常レベルに回復する。主要な消化管反応は、吐き気、嘔吐、食欲不振、胃炎、および潰瘍および口内炎でさえある。脱毛もまた、その効果は退薬後に反転し得るが、ADM処置したほぼ全ての患者で起こる。

【0007】

より重要なことは、より高用量のADMおよび他のアントラサイクリン剤の臨床適用を妨げる主要要因が、心臓毒性であることである。ADMの心臓毒性は、酸素由来のフリーラジカルの産生から生じ得る。ADM中のセミキノンは、酸化還元反応を誘導し得、これは、増強された脂質過酸化を誘導し、細胞損傷に寄与する。フリーラジカルは、細胞膜およびオルガネラ膜を損傷し、そして膜タンパク質の機能および酵素活性を改変する。これらの変化は、細胞内カルシウムの過剰蓄積(overload)、DNAおよびタンパク質合成の阻害、ならびにエネルギー代謝障害を誘導し得、必然的に、心臓の収縮弛緩プロセスを妨げる。

【0008】

心臓毒性は、ADMが身体内に蓄積された場合に起こる。なぜならば、ADMは、他の組織よりも心臓組織により高い親和性を有するからである。従って、心臓は、ADMの毒性効果に対してより脆弱である。心臓毒性は、急性または慢性であり得る。急性心臓毒性の臨床的特長としては、心臓機能の変化(例えば、洞頻拍、不整脈、伝導ブロック、およびST-Tセグメントの変質など)が挙げられる。種々の不整脈は、ADM治療の早期段階に存在し得る。急性心臓毒性としてはまた、左心室駆出フラクション(LVEF)の減少、ならびに一回拍出量(SV)の減少、心拍出量(CO)の減少、および心係数(CI)の減少が挙げられ得る。ADMはまた、左心室の収縮およびポンプ能力を阻害することが示唆されている。慢性心臓毒性としては、不可逆的なうっ血性心不全が挙げられる。一旦、患者がうっ血性心不全に罹患すると、その死亡率は、約30%～50%に減少する。心臓毒性はADMに関連するので、患者によっては、ADM治療を終了しなければならないか、またはADM使用の用量および期間を減らさなければならず、これは、ADM治療の効果に影響を及ぼす。

【0009】

その治療効果を維持しつつ、ADMの毒性を減少させる方法を見出すために、研究がなされている。特性の基準(例えば、ADMの総用量を減少させること、または心筋栄養剤(例えば、高用量のビタミンC)を投与すること)は、心筋炎を保護するのに有用であり得る。定期的な輸血および鉄キレート剤ICRF-187の投与もまた、心筋炎を保護するのにある程度効果を有する。しかし、これらの補助剤は心筋に対して有用であるが、それらは、ADMにより誘導される心臓毒性に対してほとんど効果を有さない。従って、当該分野において、その効果に影響を与えることなく、ADMの心臓毒性を予防、処置、または遅延する必要性が存在する。

【0010】

心不全は、多くの病因(例えば、冠動脈硬化、高血圧、および炎症誘導性心筋損傷)により引き起こされ、最終的に、難治性の心臓疾患を引き起こす。これらの要因は、心筋細胞構造および機能の変化を引き起こし、最終的には、心室ポンプ機能の低下および心不全を引き起こす。心不全の発生率および死亡率は、世界中で非常に高く、最も重篤な致死性疾患のひとつである。米国において、うっ血性心不全(CHF)の30%～40%が年単位の入院を必要とする。CHFの診断の確立の5年後の死亡率は、60%(男性)および40%(女性)である。平均生存期間は、3.2年(男性)および5.4年(女性)であるが、最終段階のCHFを有する患者の生存率はわずかに約20%である。

【0011】

10

20

30

40

50

ニューレギュリン - 1 ( N R G - 1 ) ( N e u 分化因子 ( N D F ) またはグリア成長因子 ( G G F ) と呼ばれる) は、 E r b B 3 および B r b B 4 のリガンドである。ニューレギュリン遺伝子欠損胎児マウスにおける研究は、ニューレギュリンが心臓および神経系の発達に必須であることを実証している。しかし、このデータは、ニューレギュリンが細胞分化および下流へのシグナル伝達を制御する方法についてに制限される。心臓発達の早期段階において、ニューレギュリンおよび E r b B レセプターは、それぞれ、心内膜および心筋細胞の内層で発現される。これらの二層は広範に隔てられているので、ニューレギュリンは、 E r b B レセプターを活性化し得る前にこれらの二層の間の空間を通過する必要がある。心臓細胞にける E r b B レセプターの活性化は、心臓細胞および心内膜へのその移動の補助となる。 W O 0 0 / 3 7 0 9 5 は、ニューレギュリンが、心筋細胞の分化を増強し得、筋節および細胞骨格の組み合わせおよび細胞内接着を強化し得ることを示す。 W O 0 0 / 3 7 0 9 5 はまた、ニューレギュリンが心臓疾患を検出、診断、および処置するのに使用され得ることを示している。 W O 0 0 / 3 7 0 9 5 はさらに、ニューレギュリンおよびそのアナログが、心臓細胞の分化をインビボで促進し、心臓細胞における筋節および細胞骨格の再構成ならびに細胞内接着を誘導し、ニューレギュリンを阻害し得るポリペプチドまたは化合物を同定し得ることを示している。同定されたポリペプチドまたは化合物は、心臓疾患および心不全を処置するのに使用され得る。

10

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 2 】

20

当該分野において、より効果的かつ/または費用効果の高い、ウイルス性心筋炎、拡張型心筋症、予防剤または治療剤 (例えば、 A D M ) の心臓毒性 (その効果に影響を及ぼすことなく)、および心筋収縮に対するニューレギュリン関連処置の必要性が存在する。本発明は、これらおよび当該分野における他の関連する必要性に取り組んでいる。

【発明の効果】

【 0 0 1 3 】

(発明の開示)

(ウイルス性心筋炎または拡張型 (うっ血性) 心筋症 ( D C M ) の処置)

1つの局面において、本発明は、哺乳動物におけるウイルス性心筋炎または拡張型 (うっ血性) 心筋症 ( D C M ) を予防、処置、または遅延するための方法に関する。この方法は、このような予防、処置、または遅延が必要とされるかまたは望ましい哺乳動物に、有効量のニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、または該ニューレギュリンの産生および/もしくは機能を増強する薬剤を投与する工程を包含し、それによって、ウイルス性心筋炎または D C M が予防、処置、または遅延される。好ましくは、ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、または該ニューレギュリンの産生および/もしくは機能を増強する薬剤は、インビボで投与される。

30

【 0 0 1 4 】

別の局面において、本発明は、組み合わせであって、有効量のニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、または該ニューレギュリンの産生および/もしくは機能を増強する薬剤、ならびにウイルス性心筋炎もしくは拡張型 (うっ血性) 心筋症 ( D C M ) のための有効量の予防剤もしくは治療剤を含む、組み合わせ、に関する。

40

【 0 0 1 5 】

さらに別の局面において、本発明は、哺乳動物におけるウイルス性心筋炎または拡張型 (うっ血性) 心筋症 ( D C M ) を予防、処置、または遅延するための薬学的組成物に関する。この組成物は、有効量のニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、または該ニューレギュリンの産生および/もしくは機能を増強する薬剤を含む。

50

## 【0016】

( 予防剤または治療剤に付随する心臓毒性の処置 )

本発明の目的は、予防剤または治療剤に付随する心臓毒性を予防、処置、または遅延させるための方法を提供することである。特に、本発明の目的は、薬物誘導性の心筋症の心臓毒性を予防、処置、または減少させる方法を提供することである。

## 【0017】

本発明は、その予防、処置、または遅延が必要とされるかまたは望ましい哺乳動物における心臓毒性を予防、処置、または遅延するための方法を提供する。この方法は、インビボで哺乳動物に、有効量の予防剤または治療剤、および有効量の ( i ) ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント ; ( i i ) ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸 ; または ( i i i ) 該ニューレギュリンの産生もしくは機能を増強する薬剤を投与する工程を包含し、それによって、該予防剤または治療剤の投与に付随する心臓毒性が予防、処置、または遅延される。

10

## 【0018】

本発明は、当業者に公知の任意の心臓毒性 ( 急性心臓毒性または慢性心臓毒性が挙げられるがこれらに限定されない ) の任意の臨床的症状を予防、処置、または遅延させるために使用され得る。例えば、本発明は、頻拍、不整脈、およびうっ血性心不全を予防、処置、または遅延させるために使用され得る。特定の実施形態において、本発明は、急性心臓毒性の臨床的特長 ( 例えば、洞頻拍、不整脈、伝導ブロック、および S T - T セグメントの変質、ならびに左心室駆出フラクション ( L V E F ) の減少、一回拍出量 ( S V ) の減少、心拍出量 ( C O ) の減少、または心係数 ( C I ) の減少 ) を予防、処置、または遅延させるために使用され得る。本発明はまた、左心室の収縮およびポンプ能力の阻害を含む細胞毒性を予防、処置、または遅延するために使用され得る。

20

## 【0019】

本発明の方法は、任意の予防剤または治療剤に付随する心臓毒性を予防、処置、または遅延するために使用され得る。1つの実施形態において、予防剤または治療剤は、心臓毒性を引き起こす酸素由来のフリーラジカルを産生する。別の実施形態において、予防剤または治療剤は、心臓毒性を引き起こす脂質の過酸化を増強する。

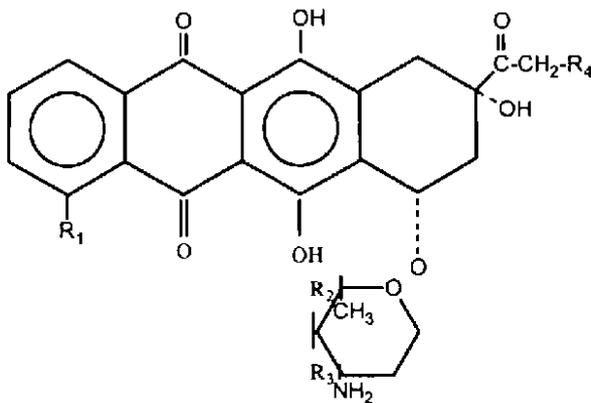
## 【0020】

本発明の方法は、抗新生物剤に付随する心臓毒性を予防、処置、または遅延させるために使用され得る。抗新生物剤は、好ましくは、アントラサイクリンである。特定の実施形態において、抗新生物剤は、以下の式 I :

30

## 【0021】

## 【化2】



40

を有し、式中、R 1 はメトキシまたは水素であり ; ならびに R 2 、 R 3 、 および R 4 は、ヒドロキシまたは水素である。本発明の方法において使用するためのアントラサイクリンの非限定的な例としては、アドリアマイシン ( またはドキソルピシン ) 、ダウノルピシン、エピルピシン、イダルピシン、ミトキサントロン、マイトマイシン、プレオマシイン

50

、シクロホフファミド、フルオロウラシル、アクチノマイシンD、およびビンクリスチンが挙げられる。1つの局面において、本発明は、化学療法剤（例えば、アドリアマイシン（ADM））により誘導される心臓毒性を予防、処置、または遅延させるための抗心臓毒性薬剤としてのニューレギュリンの、単独または別の薬剤と組み合わせての使用に関する。

【0022】

本発明の方法は、抗精神病剤に付随する心臓毒性を予防、減少、または遅延するために使用され得る。抗精神病剤は、クロルプロマジン、パーフェナジン、またはトリフルペラジンであり得る。

【0023】

本発明の方法は、三環系抗うつ剤に付随する心臓毒性を予防、減少、または遅延するために使用され得る。三環系抗うつ剤は、クロリミプラミン、アミトリプチリン、またはドキシペリンであり得る。

【0024】

本発明の方法は、インターフェロン（例えば、インターフェロン- $\alpha$ ）またはインターロイキン（例えば、インターロイキン-2）に付随する心臓毒性を予防、減少、または遅延するために使用され得る。

【0025】

本発明の方法は、抗感染剤（例えば、エメチン）に付随する心臓毒性を予防、減少、または遅延するために使用され得る。

【0026】

本発明の方法において使用するためのニューレギュリン剤は、ニューレギュリン1、ニューレギュリン2、ニューレギュリン3、またはニューレギュリン4であり得る。特定の実施形態において、本発明の方法において使用するためのニューレギュリンは、ニューレギュリン2またはニューレギュリン2である。別の実施形態において、ニューレギュリンフラグメントは、配列番号4に示されるアミノ酸配列を含むニューレギュリン2である。

【0027】

ニューレギュリン剤は、タンパク質またはその機能的フラグメントとして投与され得る。ニューレギュリン剤はまた、ニューレギュリンタンパク質またはその機能的フラグメントをコードする核酸として投与され得る。ニューレギュリンの産生または機能を増強する薬剤もまた投与され得る。ニューレギュリン剤は、単独でまたは薬学的に受容可能なキャリアもしくは賦形剤と組み合わせて投与され得る。ニューレギュリンタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリンタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、または該ニューレギュリンの産生または機能を増強する薬剤は、予防剤または治療剤の投与の前、同時、または後に投与され得る。

【0028】

1つの実施形態において、予防剤または治療剤は、その予防剤または治療剤が、ニューレギュリンタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリンタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、または該ニューレギュリンの産生もしくは機能を増強する薬剤の非存在下で投与される場合に最大限許容される量よりも高い量で投与される。

【0029】

特定の実施形態において、本発明は、その予防、処置、または遅延が必要とされるかまたは望ましいヒトにおいて、心臓毒性を予防、処置、または遅延させる方法を提供する。好ましくは、ヒトは、肺癌、乳癌、膀胱癌、精巣癌、甲状腺癌、柔組織癌、骨肉腫、神経芽腫、急性白血病、悪性リンパ腫、胃癌、肝臓癌、食道癌、および頸部癌のような悪性腫瘍を有する。

【0030】

（心筋梗塞の処置）

10

20

30

40

50

1つの局面において、本発明は、組み合わせに関し、この組み合わせは、有効量のニューレギュリントタンパク質、もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリントタンパク質をコードする核酸、もしくはその機能的フラグメント、あるいはこのニューレギュリンの産生および/もしくは機能を増強する薬剤、ならびに心筋梗塞のための有効量の予防剤または治療剤を含有する。

【0031】

別の局面において、本発明は、キットに関し、このキットは、容器内の上記組み合わせ、および心筋梗塞を予防するか、処置するか、または遅延させる際にこの組み合わせを使用するための指示書を備える。

【0032】

なお別の局面において、本発明は、哺乳動物において心筋梗塞を予防するか、処置するか、または遅延させるための方法に関し、この方法は、このような予防、処置または遅延が必要とされるかまたは望ましい哺乳動物に、有効量のニューレギュリントタンパク質、もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリントタンパク質をコードする核酸、もしくはその機能的フラグメント、あるいはこのニューレギュリンの産生および/もしくは機能を増強する薬剤を投与し、これによって、この心筋梗塞が予防されるか、処置されるか、または遅延される工程を包含する。

【0033】

(薬学的組成物)

1つの局面において、本発明は、哺乳動物において疾患を予防するか、処置するか、または遅延させるための薬学的組成物に関し、この組成物は、ニューレギュリントタンパク質、またはその機能的フラグメントを、a) 約170 U/kg以下の安全用量で；またはb) 約3,600 U/kg以下の全レジメンで、含有する。

【0034】

(発明を実施するための形態)

開示の明瞭さのために、そして限定によってではなく、本発明の詳細な説明が、以下の小節に分割される。

【0035】

(A. 定義)

他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって通常理解されるものと同じ意味を有する。本明細書中に記載される全ての特許、出願、出願公開、および他の刊行物は、その全体が、参考として援用される。この節に記載される定義が、本明細書中に参考として援用される特許、出願、出願公開、および他の刊行物に記載される定義と矛盾するかまたは他に一致しない場合は、この節に記載される定義が、本明細書中に参考として援用される定義より優勢である。

【0036】

本明細書中において使用される場合、「a」または「an」は、「少なくとも1つ」または「1以上」を意味する。

【0037】

本明細書中において使用される場合、「ニューレギュリン」とは、ErbbB2/ErbbB4ヘテロダイマープロテインキナーゼまたはErbbB2/ErbbB3ヘテロダイマープロテインキナーゼを活性化し得る、タンパク質またはペプチド(例えば、全てのニューレギュリンアイソフォーム、ニューレギュリンEGFドメイン単独、ニューレギュリン変異体、および上記レセプターを同様に活性化する任意の種類の新レギュリン様遺伝子産物)をいう。例示的なニューレギュリンフラグメントは、ヒトニューレギュリン 2異性体のポリペプチドフラグメントであり、これは、レセプター結合ドメイン(すなわち、EGF様ドメイン)を含む。このポリペプチドは、EGFレセプターファミリーのErbbBレセプターを活性化し得、そしてその生物学的反応を調節し得る(例えば、乳癌細胞分化およびミルクプロテイン分泌を刺激し得；神経堤細胞のシュワン細胞への分化を誘導し得

10

20

30

40

50

；骨格筋細胞におけるアセチルコリン合成を刺激し得；そして心臓細胞の生存およびDNA合成を改善し得る）。ニューレギュリンはまた、抗ウイルス心筋炎活性、抗DCM活性、抗心臓毒性活性、または抗心筋梗塞活性を実質的に変化させない、保存的アミノ酸置換を有する改変体を含む。アミノ酸の適切な保存的置換は、当該分野の当業者に公知であり、そして一般に、得られる分子の生物学的活性を変化させずになされ得る。当該分野の当業者は、一般に、ポリペプチドの非必須領域における単一のアミノ酸置換が、生物学的活性を実質的に変化させないことを認識する（例えば、Watsonら、Molecular Biology of the Gene, 第4版、1987、The Benjamin/Cummings Pub. Co., p224を参照のこと）。ニューレギュリタンパク質は、ニューレギュリタンパク質およびニューレギュリンペプチドを包含する。ニューレギュリン核酸は、ニューレギュリン核酸およびニューレギュリンオリゴヌクレオチドを包含する。

10

## 【0038】

本明細書中において使用される場合、「上皮増殖因子様ドメイン」または「EGF様ドメイン」とは、ErbB2、ErbB3、ErbB4、またはこれらの組み合わせに結合し、そしてこれらを活性化させ、そしてEGFレセプター結合ドメインと類似の構造を保有する、ニューレギュリン遺伝子によってコードされるポリペプチドモチーフをいう。これらは、WO 00/64400、Holmesら、Science, 256:1205-1210 (1992)；米国特許第5,530,109号および同第5,716,930号；Hijaziら、Int. J. Oncol. 13:1061-1067 (1998)；Changら、Nature, 387:509-512 (1997)；Carrawayら、Nature, 387:512-516 (1997)；Higashiyamaら、J. Biochem., 122:675-680 (1997)；ならびにWO97/09425に開示されている。

20

## 【0039】

本明細書中において使用される場合、ニューレギュリンの「機能的誘導体またはフラグメント」とは、その抗ウイルス心筋炎活性、抗DCM活性、抗心臓毒性活性、または抗心筋梗塞活性をなお実質的に保持する、ニューレギュリタンパク質またはそのコード核酸の誘導体またはフラグメントをいう。通常、誘導体またはフラグメントは、その抗ウイルス心筋炎活性、抗DCM活性、抗心臓毒性活性、または抗心筋梗塞活性の少なくとも50%を保持する。好ましくは、誘導体またはフラグメントは、その抗ウイルス心筋炎活性、抗DCM活性、抗心臓毒性活性、または抗心筋梗塞活性の少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、99%および100%を保持する。

30

## 【0040】

本明細書中において使用される場合、「ニューレギュリンの産生を増強する薬剤」とは、ニューレギュリン遺伝子の転写および/または翻訳を増加させる物質、あるいはニューレギュリン前駆体の翻訳後修飾および/または細胞輸送を増加させる物質、あるいはニューレギュリタンパク質の半減期を延長させる物質をいう。

## 【0041】

本明細書中において使用される場合、「ニューレギュリンの機能を増強する薬剤」とは、ニューレギュリンの抗ウイルス心筋炎活性、抗DCM活性、抗心臓毒性活性、または抗心筋梗塞活性の強さを増加させる物質、あるいは抗ウイルス心筋炎シグナル伝達経路、抗DCMシグナル伝達経路、抗心臓毒性活性シグナル伝達経路、または抗心筋梗塞シグナル伝達経路におけるニューレギュリンの天然リガンドの感受性を増加させる物質、あるいはニューレギュリンのアンタゴニストの強さを低下させる物質をいう。このような薬剤は、ニューレギュリタンパク質でもそのコード核酸でもない。

40

## 【0042】

本明細書中において使用される場合、「組み合わせ」とは、2つの物品の間、またはより多くの物品の間の任意の連合をいう。

## 【0043】

50

本明細書中において使用される場合、「組成物」とは、2つ以上の生成物または化合物の任意の混合物をいう。これは、溶液、懸濁液、液体、粉末、ペースト、水性、非水性、またはこれらの任意の組み合わせであり得る。

【0044】

本明細書中において使用される場合、「erb」とは、赤芽球症ウイルス（急性トランスホーミングレトロウイルス）と会合した2つの癌遺伝子（erb Aおよびerb B）をいう。

【0045】

本明細書中において使用される場合、「特定の疾患を処置するために有効な化合物の量」とは、疾患に関連する症状を軽減するか、または何らかの様式で減少させるために十分な量である。このような量は、単一の用量として投与され得るか、または効果的であるレジメンに従って投与され得る。この量は、疾患を治癒し得るが、代表的に、疾患の症状を軽減するために投与される。症状の所望の軽減を達成するために、繰り返しの投与が必要とされ得る。

10

【0046】

本明細書中において使用される場合、「心不全」とは、心臓が組織を代謝する要件のために必要とされる割合で血液をポンピングしない、心臓機能の異常性を意味する。心不全としては、広範な疾患状態（例えば、うっ血性心不全、心筋梗塞、頻脈性不整脈、家族性肥大型心筋症、虚血性心臓病、特発性拡張型心筋症、および心筋炎）が挙げられる。心不全は、多数の要因（虚血性形態、先天性形態、リウマチ性形態、または特発性形態が挙げられる）によって引き起こされ得る。慢性心臓肥大は、うっ血性心不全および心停止に対する前駆体である、非常に疾患した状態である。

20

【0047】

本明細書中において使用される場合、「組換え手段による産生」とは、クローニングされた核酸によってコードされるタンパク質を発現させるために、分子生物学の周知の方法に依存する組換え核酸方法を使用する、産生方法をいう。

【0048】

本明細書中において使用される場合、「相補」とは、2つの核酸分子をいう場合に、ヌクレオチドの2つの配列が、対向するヌクレオチドの間で、好ましくは25%未満のミスマッチで、より好ましくは15%未満のミスマッチで、なおより好ましくは5%未満のミスマッチで、最も好ましくはミスマッチなしでハイブリダイゼーションし得ることを意味する。好ましくは、これらの2つの分子は、高ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズする。

30

【0049】

本明細書中において使用される場合、ミスマッチの百分率を決定する際の「ハイブリダイゼーションのストリンジェンシー」とは、以下の通りである：

- 1) 高ストリンジェンシー：0.1 x S S P E、0.1% S D S、65；
- 2) 中ストリンジェンシー：0.2 x S S P E、0.1% S D S、50（中程度のストリンジェンシーともまた称される）；および
- 3) 低ストリンジェンシー：1.0 x S S P E、0.1% S D S、50。

40

等価なストリンジェンシーが、代替の緩衝液、塩および温度を使用して達成され得ることが、理解される。

【0050】

本明細書中において使用される場合、「ベクター（またはプラスミド）」とは、異種DNAを、その発現または複製のために細胞に導入するために使用される、不連続なエレメントをいう。このようなビヒクルの選択および使用は、当業者に周知である。発現ベクターとしては、調節配列（例えば、プロモーター領域であり、これは、このようなDNAフラグメントの発現を引き起こし得る）と作動可能に結合したDNAを発現し得るベクターが挙げられる。従って、発現ベクターとは、組換えDNA構築物または組換えRNA構築物（例えば、プラスミド、ファージ、組換えウイルスまたは適切な宿主細胞への導入の際

50

にクローニングされたDNAの発現を生じる他のベクター)をいう。適切な発現ベクターは、当業者に周知であり、そして真核生物細胞および/または原核生物細胞において複製可能なもの、ならびにエピソームを保持するもの、あるいは宿主細胞ゲノムに統合されるものが挙げられる。

#### 【0051】

本明細書中において使用される場合、「プロモーター領域またはプロモーターエレメント」とは、DNAまたはRNAの、これらが作動可能に結合されるDNAもしくはRNAの転写を制御するセグメントをいう。プロモーター領域は、RNAポリメラーゼの認識、結合および翻訳開始のために十分な特定の配列を含む。プロモーター領域のこの部分は、プロモーターと称される。さらに、プロモーター領域は、RNAポリメラーゼのこの認識活性、結合活性、および転写開始活性を調節する配列を含む。これらの配列は、シス作用性であり得るか、またはトランス作用性因子に応答性であり得る。プロモーターは、調節の性質に依存して、構成的であっても調節的であってもよい。原核生物においての使用が意図される例示的なプロモーターとしては、バクテリオファージT7プロモーターおよびT3プロモーターなどが挙げられる。

10

#### 【0052】

本明細書中において使用される場合、「作動可能に連結されるかまたは作動可能に会合する」とは、DNAの、ヌクレオチドの調節配列およびエフェクター配列(例えば、プロモーター、エンハンサー、転写停止部位および翻訳停止部位、ならびに他のシグナル配列)との機能的関係をいう。例えば、DNAのプロモーターに対する作動可能な結合とは、DNAとプロモーターとの間の、このようなDNAの転写がこのDNAを特異的に認識し、結合し、そして転写するRNAポリメラーゼによってプロモーターから開始されるような、物理的関係および機能的関係をいう。発現および/またはインビトロ転写を最適化するために、クローンの5'非翻訳部分を除去するか、付加するか、または変化させて、転写レベルまたは翻訳レベルのいずれかで発現を妨害し得るかまたは減少させ得る、余分の、潜在的に不適切な代替の翻訳開始(initiation)(すなわち、開始(start))コドンまたは他の配列を排除することが、必要であり得る。あるいは、コンセンサスリボソーム結合部位(例えば、Kozak, J. Biol. Chem., 266: 19867-19870 (1991))を参照のことが、開始コドンのすぐ5'側に挿入され得、そして発現を増強し得る。このような修飾の所望性(または必要性)は、実験的に決定され得る。

20

30

#### 【0053】

本明細書中で使用される場合、「処置」または「処置すること」とは、状態、障害または疾患の症状が、回復されるかそうでなければ有益に改変される任意の様式をいう。処置はまた、本明細書中の組成物の任意の薬学的使用を包含する。特定の障害の症状の回復とは、永久であろうと一時的であろうと、組成物の投与に起因し得るかまたは組成物の投与に関連し得る、症状の任意の減少をいう。

#### 【0054】

本明細書中で使用される場合、「新生物(新生物形成)」とは、異常な新しい増殖または腫瘍増殖をいい、これは、良性または悪性であり得る。過形成と異なって、新生物増殖は、元の刺激が非存在であっても持続する。

40

#### 【0055】

本明細書中で使用される場合、「抗新生物剤」とは、新生物、腫瘍または癌の発生を予防するかまたはそれらの重篤度を減少させるために使用される任意の薬剤をいう。これらとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない:抗脈管形成剤、アルキル化剤、代謝拮抗物質、天然産物、白金コーディネート複合体、アントラセニジオン(anthracedione)、置換尿素、メチルヒドラジン誘導体、副腎皮質抑制剤、ホルモン、アンタゴニスト、オンコジーンインヒビター、腫瘍抑制遺伝子もしくは腫瘍抑制タンパク質抗オンコジーン抗体または抗オンコジーンアンチセンスオリゴヌクレオチド。

#### 【0056】

50

本明細書中で使用される場合、「抗精神病性剤 (anti-psychotic agent)」とは、精神障害の処置に使用される任意の薬剤をいう。これらとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：三環系フェノチアジン、チオキサントンおよびジベンゼピン (dibenzepine)、ならびにブチロフェノンならびに同種属、他の複素環および実験的ベンズアミド。

【0057】

本明細書中で使用される場合、「三環系抗うつ剤」とは、うつ病の処置に使用される任意の薬剤をいう。これらとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：神経終末へと取り込まれるノルエピネフリンおよびセロトニンを阻害し、従って、脳におけるノルアドレナリン持続性亢進を導く薬剤をいう。

10

【0058】

本明細書中で使用される場合、「抗感染剤」とは、感染疾患を処置するのに使用される任意の薬剤をいう。これらとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：寄生虫感染、細菌感染または微生物感染に対して使用するための薬剤。

【0059】

本明細書中で使用される場合、「安全な用量」とは、哺乳動物に過度の毒性または他の副作用を含まずに哺乳動物における疾患を予防するか、処置するかまたは遅延するのに十分な用量をいう。

【0060】

本明細書中で使用される場合、「心筋梗塞」とは、冠状動脈の遮断 (血流妨害) をいい、これは、重篤な虚血または持続性虚血によって引き起こされる心筋部分の限局性壊死 (focal necrosis) を導く。

20

【0061】

(B. ウイルス性心筋炎またはDCMを予防、処置または遅延する方法)

1つの局面において、本発明は、哺乳動物におけるウイルス性心筋炎もしくは拡張型 (うっ血性の) 心筋症 (DCM) を予防するか、処置するかもしくは遅延するための方法に関し、この方法は、このような予防、処置または遅延が必要とされるかまたは所望である哺乳動物に、有効量のニューレギュリン (neuregulin) タンパク質もしくはその機能的フラグメントまたはニューレギュリンタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、またはニューレギュリンの生産および/または機能を増大する因子を投与し、それによってウイルス性心筋炎またはDCMを予防、処置または遅延する工程を包含する。

30

【0062】

本方法は、任意の哺乳動物 (例えば、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、雌ウシ、雄ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、サルおよび他の非ヒト霊長類) におけるウイルス性心筋炎またはDCMを予防、処置または遅延するために使用され得る。好ましくは、本方法は、ヒトにおけるウイルス性心筋炎またはDCMを予防、処置または遅延するために使用され得る。

【0063】

任意の適切なニューレギュリンタンパク質もしくはその機能的フラグメントまたはニューレギュリンタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸は、本方法に使用され得る。1つの特定の実施形態において、本方法に使用されるニューレギュリンは、Erbb2 - Erbb4 レセプターを用いる結合を介して抗ウイルス性心筋炎または抗DCM活性を行う。別の特定の実施形態において、ニューレギュリン1、ニューレギュリン2、ニューレギュリン3またはニューレギュリン4が、本方法に使用される。ニューレギュリン1の同義語としては、ヘレグリン、GGF2およびp185erbb2リガンドを含む。例えば、WO00/64400ならびに米国特許第5,530,109号および同第5,716,930号を参照のこと。ニューレギュリン2およびニューレギュリン2の両方が、本方法に使用される。好ましくは、配列番号4に示されるアミノ酸配列を含むニューレギュリン2フラグメントが、本方法に使用される。

40

50

## 【0064】

なお別の特定の実施形態において、以下の特許、特許出願およびGenBankデータベースに開示されるニューレギュリンまたはその機能的フラグメントが、本方法に使用される：米国特許第6,252,051号および同第6,121,415(NRG3)号；同第6,087,323号(p185<sup>erbB<sup>2</sup></sup>結合活性、p185<sup>erbB<sup>3</sup></sup>結合活性またはp185<sup>erbB<sup>4</sup></sup>結合活性を有するニューレギュリン)；同第6,033,906(p185<sup>erbB<sup>2</sup></sup>およびp180<sup>erbB<sup>4</sup></sup>からなる群から選択されるレセプターのリガンドとしてのニューレギュリン)；US2002002276(ニューレギュリンの競合的アンタゴニストまたはアゴニストとしてのキメラErbBヘテロマルチマー付着因子)；WO01/81540(NRG-4)；WO01/64877(NRG1)；WO01/64876(NRG1AG1)；WO01/58948(ニューレギュリン-)；WO01/26607(SMDFおよびGGFのニューレギュリンスプライス改変体アイソフォーム)；WO00/70322(CRDニューレギュリン)；WO00/64400；WO99/18976；WO98/02540(ニューレギュリンの競合的アンタゴニストまたはアゴニストとしてのキメラErbBヘテロマルチマー付着因子)；WO96/30403；WO96/15812；BC017568(Homo sapiens、ニューレギュリン4に類似する)；BC007675(Homo sapiens、ニューレギュリン1)；AF142632(Xenopus laevisシステインリッチドメインニューレギュリン-1)；AF194439(Rattus norvegicus SMDFニューレギュリン 2a(Nrg1))；AF194438(Rattus norvegicus SMDFニューレギュリン 1a(Nrg1))；HS2NRG12(Homo sapiens 選択的スプライシングニューレギュリン2(NRG2))；HS2NRG08(Homo sapiens 選択的スプライシングニューレギュリン2(NRG2))；HS2NRG07(Homo sapiens 選択的スプライシングニューレギュリン2(NRG2))；AF083067(Mus musculusニューレギュリン-4短型アイソフォーム(Nrg4))；AF076618(Xenopus laevisニューレギュリン-1)；AF045656(Gallus gallusニューレギュリン-2b)；AF045655(Gallus gallusニューレギュリン-2a)；AF045654(Gallus gallusニューレギュリン-1a)；MAU96612(Mesocricetus auratusニューレギュリン)；AF010130(Mus musculusニューレギュリン-3(NRG3))。好ましくは、GenBank受託番号NT\_007995(gi:18570363)に開示されるニューレギュリンは、本方法において使用される。

## 【0065】

任意のウイルス性心筋炎は、本方法を使用して、予防、処置または遅延され得る。例えば、Coxsackie Group Aウイルス、Coxsackie Group Bウイルス、ECHOウイルスまたはポリオウイルスの感染によって引き起こされるかまたはこれらに関連するウイルス性心筋炎は、本方法を使用して、予防、処置または遅延され得る。好ましくは、Coxsackie Group Bウイルスの感染によって引き起こされるかまたはこれに関連するウイルス性心筋炎は、本方法を使用して、予防、処置または遅延される。

## 【0066】

種々の臨床的特徴を有するウイルス性心筋炎は、本方法を使用して、予防、処置または支援され得る。例えば、心外膜炎または心内膜炎による合併症を伴うウイルス性心筋炎は、本方法を使用して、予防、処置または遅延され得る。別の実施形態において、心筋損傷、心機能不全、不整脈、全身性症状または心筋症の臨床的特徴を有するウイルス性心筋炎が、本方法を使用して、予防、処置または遅延され得る。急性または慢性のウイルス性心筋炎の両方が、本方法を使用して、予防、処置または遅延され得る。好ましくは、不整脈、心不全または心臓性ショックを伴う急性ウイルス性心筋炎が、本方法を使用して、予防、処置または遅延され得る。心臓の肥大および/または永久性の心筋損傷で延長される

ウイルス性心筋炎がまた、本方法を使用して、予防、処置または遅延され得る。

【0067】

種々の臨床的特徴を有するDCMが、本方法を使用して、予防、処置または遅延され得る。例えば、心室肥大、心筋ポンプ機能不全またはうっ血性心不全を伴うDCMが、本方法を使用して、予防、処置または遅延され得る。

【0068】

ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントまたはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸は、単独で投与され得る。あるいは、ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントまたはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸は、薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤と共に投与され得る。

10

【0069】

ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントまたはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸は、インビボで投与され得る（すなわち、哺乳動物に直接的に投与され得る）。あるいは、ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントまたはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸は、エキソビボで投与され得（すなわち、細胞、組織または器官に投与され）、そしてニューレギュリタンパク質を保有するこのような細胞、組織または生物体もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸は、哺乳動物へと移され得る）。

20

【0070】

1つ特定の実施形態において、ニューレギュリタンパク質またはその機能的フラグメントが投与される。別の特定の実施形態において、ニューレギュリタンパク質またはその機能的フラグメントをコードする核酸が投与される。

【0071】

ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントまたはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸は、単独で使用され得る。あるいは、ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントまたはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸は、ウイルス性心筋炎またはDCMのための予防薬または治療剤と組み合わせて使用され得る。ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントまたはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸は、ウイルス性心筋炎またはDCMのための予防薬または治療剤の投与の前、同時または引き続いて、使用され得る。

30

【0072】

ウイルス性心筋炎のための任意の適切な予防薬または治療剤が、本方法に使用され得る。例えば、ウイルス性心筋炎のための予防薬または治療剤は、抗生物質（例えば、ペニシリン）、心臓保護剤（例えば、タウリン）、抗酸化剤（例えば、ビタミンC、ビタミンEおよびコエンザイムQ10）ならびに心筋のための栄養物（例えば、エネルギーの組み合わせ）であり得る。

【0073】

DCMのための任意の適切な予防薬または治療剤が、本方法に使用され得る。例えば、DCMのための予防薬または治療剤は、以下であり得る：心臓強壮薬（例えば、ジゴキシンおよびセジラニド（cedilanid））、利尿薬（GoodmanおよびGilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (9th Ed.), McGraw-Hill (1996) pp 683-713）（例えば、炭酸アンヒドラーゼのインヒビター、浸透圧利尿薬、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  共輸送のインヒビター、 $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$  共輸送のインヒビター、腎臓上皮 $\text{Na}^+$ チャネルのインヒビターおよび鉍質コルチコイドレセプターのアンタゴニスト）、アンジオテンシンI-変換酵素インヒビター（ACEI）、カルシウムアンタゴニスト（例えば、アムロジピン）ならびにレセプターアンタゴニスト（例えば、カルベディロール）。

40

50

## 【0074】

(C. ウイルス性心筋炎またはDCMを予防、処置または遅延するための薬学的組成物、キットおよび組み合わせ)

別の局面において、本発明は、哺乳動物におけるウイルス性心筋炎または拡張型(うっ血性の)心筋症(DCM)を予防、処置または遅延するための薬学的組成物に関し、この薬学的組成物は、有効量のニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントまたはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、またはニューレギュリンの生産および/または機能を増大する因子を含む。

## 【0075】

任意の適切なニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸(上記のセクションBに記載されるものを含む)は、本発明の薬学的組成物に使用され得る。1つの特定の実施形態において、本発明の薬学的組成物に使用されるニューレギュリンは、ErbbB2-ErbbB4レセプターを用いる結合によって、その抗ウイルス性心筋炎活性または抗DCM活性を実施する。別の実施形態において、ニューレギュリン1、ニューレギュリン2、ニューレギュリン3またはニューレギュリン4は、本発明の薬学的組成物に使用される。ニューレギュリン1の同義語としては、ヘレグリン、GGF2およびp185erbB2リガンドが挙げられる。例えば、WO00/64400ならびに米国特許第5,530,109号および同第5,716,930を参照のこと。ニューレギュリン2およびニューレギュリン2の両方は、本発明の薬学的組成物に使用され得る。好ましくは、配列番号4に示されるアミノ酸配列セットを含むニューレギュリン2フラグメントは、本発明の薬学的組成物に使用される。

## 【0076】

ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸は、任意の適切な用量範囲で使用され得る。例えば、ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸は、約25 $\mu$ g~約2,500 $\mu$ gの範囲の用量を有し得る。

## 【0077】

なお別の局面において、本発明はキットに関し、このキットは、ウイルス性心筋炎またはDCMを予防、処置または遅延する際に、容器に入った上記の薬学的組成物および前記薬学的組成物を使用するための指示書を備える。

## 【0078】

なお別の局面において、本発明は組み合わせに関し、この組み合わせは、有効量のニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、または前記ニューレギュリンの生産および/または機能を増大する因子、および有効量のウイルス性心筋炎または拡張型(うっ血性)心筋症(DCM)のための予防薬または治療剤を含む。

## 【0079】

任意の適切なニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸(上記のセクションBに記載されるものを含む)は、本発明の組み合わせに使用され得る。1つの特定の実施形態において、本発明の組み合わせに使用されるニューレギュリンは、ErbbB2-ErbbB4レセプターを用いる結合によってその抗ウイルス性心筋炎活性または抗DCM活性を実施する。別の特定の実施形態において、ニューレギュリン1、ニューレギュリン2、ニューレギュリン3またはニューレギュリン4は、本発明の組み合わせに使用される。ニューレギュリン1の同義語としては、ヘレグリン、GGF2およびp185erbB2リガンドが挙げられる。例えば、WO00/64400ならびに米国特許第5,530,109号および同第5,716,930を参照のこと。ニューレギュリン2およびニューレギュリン2の両方は、本発明の組み合わせに使用され得る。好ましくは、配列番号1

に示されるアミノ酸配列セットを含むニューレギュリン 2フラグメントは、本発明の組み合わせに使用される。

【0080】

ウイルス性心筋炎のための任意の適切な予防薬または治療剤（上記のセクションBに記載されるものを含む）が、本発明の組み合わせに使用され得る。例えば、ウイルス性心筋炎のための予防薬または治療剤は、抗生物質（例えば、ペニシリン）、心臓保護剤（例えば、タウリン）、抗酸化剤（例えば、ビタミンC、ビタミンEおよびコエンザイムQ10）ならびに心筋のための栄養物（例えば、エネルギーの組み合わせ）であり得る。

【0081】

DCMのための任意の適切な予防薬または治療剤（上記のセクションBに記載されるものを含む）が、本発明の組み合わせに使用され得る。例えば、DCMのための予防薬または治療剤は、以下であり得る：心臓強壮薬（例えば、ジゴキシンおよびセジラニド）、利尿薬（例えば、炭酸アンヒドラーゼのインヒビター、浸透圧利尿薬、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ 共輸送のインヒビター、 $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$ 共輸送のインヒビター、腎臓上皮 $\text{Na}^+$ チャネルのインヒビターおよび鉍質コルチコイドレセプターのアンタゴニスト）、アンジオテンシンI-変換酵素インヒビター（ACEI）、カルシウムアンタゴニスト（例えば、アムロジピン）ならびにレセプターアンタゴニスト（例えば、カルベディロール）。

【0082】

なお別の局面において、本発明はキットに関し、このキットは、ウイルス性心筋炎またはDCMを予防、処置または遅延する際の、容器に入った上記の組み合わせおよび前記組み合わせを使用するための指示書を備える。

【0083】

（D. 心臓毒性を予防、処置または遅延するための方法）

ニューレギュリンは、心臓の筋細胞の分化を促進し、そして筋節と細胞骨格との組み合わせならびに細胞間接着力を強化することが見出されている（WO00/37095）。ニューレギュリンはまた、心臓疾患を検出し、診断し、そして処置するために使用され得る。本発明の方法において、ニューレギュリンは、他の予防剤または治療剤に起因して、心臓毒性を予防、処置または遅延するための心臓保護剤として使用される。

【0084】

1つの局面において、本発明は、哺乳動物（心臓毒性の予防、処置または遅延が必要とされるかまたはこれらを所望する哺乳動物）において心臓毒性を予防、処置または遅延するための方法に関し、この方法は、インピボで、哺乳動物に、有効量の予防薬または治療剤および有効量の（i）ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント；（ii）またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸；または（iii）ニューレギュリンの生産または機能を増大する因子を投与する工程を包含し、それによって前記予防薬または治療剤の投与に関連する心臓毒性が、予防、処置または遅延される。本方法は、任意の哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、雌ウシ、雄ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、サルおよび他の非ヒト霊長類）における心臓毒性を予防、処置または遅延するために使用され得る。好ましくは、本方法は、ヒトにおける心臓毒性を予防、処置または遅延するために使用される。

【0085】

（1. ニューレギュリン剤）

任意の適切なニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸が、本発明の方法で使用され得る。一実施形態において、本発明の方法は、ヒトニューレギュリン 2異性体のポリペプチドフラグメントを使用し、このヒトニューレギュリン 2異性体は、レセプター結合ドメイン（すなわち、EGFクラス領域）を含む。このポリペプチドは、EGFレセプターファミリーのerbBレセプターを活性化し得、かつその生物学的反応を調節し得る（例えば、乳癌細胞の分化および乳汁タンパク質分泌を刺激し；Schwann細胞への神経冠細胞の分化を誘導し；骨格筋細胞におけるアセチルコリン合成を刺

10

20

30

40

50

激し；そして/または心筋細胞生存およびDNA合成を改善する)。ニューレギュリンの核酸およびタンパク質は、当該分野で公知の任意の適切な方法(組換え生成、キメラ合成またはこの両者の組合せを含むが、これらに限定されない)によって生成され得る。好ましくは、ニューレギュリンの核酸およびタンパク質は、組換え生成によって生成される(Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. 2002を参照のこと)。

#### 【0086】

その抗心臓毒性活性を実質的に変更しない保存的アミノ酸置換を有するニューレギュリン改変体はまた、本発明の方法において使用され得る。アミノ酸の適切な保存的置換は、当業者に公知であり、そして一般に、得られる分子の生物学的活性を変更することなく作製され得る。当業者は、一般に、ポリペプチドの非必須領域における単一のアミノ酸置換が、生物学的活性を実質的に変更しないということ認識する(例えば、Watsonら、Molecular Biology of the Gene, 第4版、224頁、The Benjamin/Cummings Pub. Co., 1987を参照のこと)。

#### 【0087】

ニューレギュリントタンパク質またはその機能的フラグメントをコードする核酸は、裸のDNA、複合体化DNA、cDNA、プラスミドDNA、RNA、またはそれらの他の混合物の形態で、遺伝子送達系の成分として使用され得る。別の実施形態において、ニューレギュリントタンパク質またはその機能的フラグメントをコードする核酸は、ウイルスベクターに含まれる。遺伝子治療に適切な任意のウイルスベクターが使用され得る。非限定的な例としては、アデノウイルスベクター(米国特許第5,869,305号)、シミアンウイルスベクター(米国特許第5,962,274号)、条件付きで複製するヒト免疫不全ウイルスベクター(米国特許第5,888,767号)、レトロウイルス、SV40、単純ヘルペスウイルスアンプリコンベクター、およびワクシニアウイルスベクターが挙げられる。さらに、これらの遺伝子は、脂質が、凝固の間に酸化からDNAまたは他の生体物質を保護する非ウイルスベクター系(例えば、リポソーム)の形態で送達され得る。

#### 【0088】

特定の実施形態において、本発明の方法で使用されるニューレギュリンは、その抗心臓毒性活性を、任意のerbB2レセプター~erbB4レセプターとの結合によって実施する。別の特定の実施形態において、ニューレギュリン1、ニューレギュリン2、ニューレギュリン3またはニューレギュリン4が、本発明の方法で使用される。ニューレギュリン1の同意語としては、ヘレグリン(heregulin)、GGF2およびp185erbB2リガンドが挙げられる(例えば、WO00/64400、ならびに米国特許第5,530,109号および同第5,716,930号を参照のこと)。ニューレギュリン2およびニューレギュリン2の両方は、本発明の方法で使用され得る。好ましくは、配列番号4に記載されるアミノ酸配列を含むニューレギュリン2フラグメントが本発明の方法で使用される。

#### 【0089】

さらに別の特定の実施形態において、以下の特許、特許出願およびGenBankデータベースで開示されるニューレギュリンまたはその機能的フラグメントが、本発明の方法で使用され得る：米国特許第6,252,051号および同第6,121,415号(NRG3)；同第6,087,323号(p185<sup>erbB2</sup>、p185<sup>erbB3</sup>またはp185<sup>erbB4</sup>結合活性を有するニューレギュリン)；同第6,033,906号(p185<sup>erbB2</sup>およびp185<sup>erbB4</sup>からなる群から選択されるレセプターに対するリガンドとしてのニューレギュリン)；US2002002276(ニューレギュリンの競合的アンタゴニストまたはアゴニストとしてのキメラErbBヘテロマルチマー付着因子)；WO01/81540(NRG-4)；WO01/64877(NRG1)；WO01/64876(NRG1AG1)；WO01/58948(ニューレギュリン

10

20

30

40

50

); WO 01/26607 (SMD FおよびGGFニューレギュリンスプライズ改変アイソフォーム); WO 00/70322 (CRD - ニューレギュリン); WO 00/64400; WO 99/18976; WO 98/02540 (ニューレギュリンの競合的アンタゴニストまたはアゴニストとしてのキメラErbBヘテロマルチマー付着因子); WO 96/30403; WO 96/15812; BC 017568 (Homo Sapiens, ニューレギュリン4と類似); BC 007675 (Homo Sapiens, ニューレギュリン1); AF 142632 (Xenopus laevisシステインリッチドメインニューレギュリン1); AF 194439 (Rattus norvegicus SMD Fニューレギュリン 2a (Nrg1)); AF 194438 (Rattus norvegicus SMD Fニューレギュリン 1a (Nrg1)); HS 2NRG 12 (Homo sapiensの選択的スプライシングニューレギュリン2 (NRG2)); HS 2NRG 08 (Homo sapiensの選択的スプライシングニューレギュリン2 (NRG2)); HS 2NRG 07 (Homo sapiensの選択的スプライシングニューレギュリン2 (NRG2)); AF 083067 (Mus musculusニューレギュリン4ショートアイソフォーム (Nrg4)); AF 076618 (Xenopus laevisニューレギュリン - 1); AF 045656 (Gallus gallusニューレギュリン - 2b); AF 045655 (Gallus gallusニューレギュリン - 2a); AF 045654 (Gallus gallusニューレギュリン - 1a); MAU 96612 (Mesocricetus auratusニューレギュリン); AF 010130 (Mus musculusニューレギュリン3 (NRG3))。好ましくは、GenBank登録番号NT\_007995 (gi: 18570363) に開示されるニューレギュリンが、本発明の方法で使用される。

10

20

30

40

50

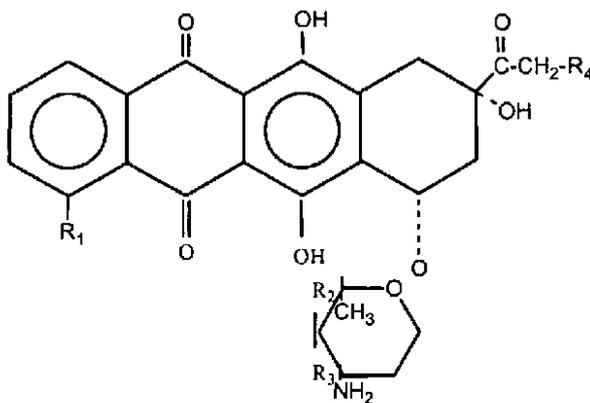
#### 【0090】

##### (2. 予防剤または治療剤)

本発明は、予防剤または治療剤の投与に関連する心臓毒性を予防、処置または遅延するための方法を提供する。ニューレギュリン剤は、この予防剤または治療剤の投与の前、これと同時に、またはこれの後に投与され得る。本発明の方法は、特定の予防剤または治療剤に関連する心臓毒性の予防、処置または遅延に限定されない。本発明の方法で使用するための予防剤または治療剤の非限定的な例としては、抗腫瘍剤、抗精神病剤、三環系抗鬱剤、インターフェロン、インターロイキンおよび抗感染剤が挙げられる。任意の抗腫瘍剤が本発明の方法で使用され得る。好ましくは、抗腫瘍剤は、以下の式を有するアントラサイクリン抗腫瘍剤である：

#### 【0091】

##### 【化3】



ここで、R1は、メトキシまたは水素であり；そしてR2、R3およびR4は、ヒドロキシまたは水素である。

#### 【0092】

アントラサイクリン抗腫瘍剤の非限定的な例としては、アドリアマイシン（またはドキ

ソルピシン)、ダウノルピシン、エピルピシン、イダルピシン、ミトキサントロン、マイトマイシン、プレオマイシン、シクロホスファミド、フルオロウラシル、アクチノマイシンD、ピンクリスチン、およびこれらの誘導体が挙げられる(Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第9版、pp. 1264 - 1269, McGraw-Hill 1996を参照のこと)。本発明の方法で使用され得る抗腫瘍剤の他の例は、米国特許出願番号2002/044919に記載される。他の抗腫瘍剤としては、シチジン、アラビノシルアデニン(arac)、ダウノマイシン、メトトレキサート(MTX)、フッ化ピリミジン(例えば、5-フルオロウラシル(5-FU))、ヒドロキシウレア、6-メルカプトプリン、植物アルカロイド(例えば、ピンクリスチン(VCR)、VP-16およびビンブラスチン(VLB))、アルキル化剤、シスプラチン、ナイトロジェンマスタード、トリサミン(trisamine)、プロカルバジン、プレオマイシン、マイトマイシンC、アクチノマイシンD、または酵素(例えば、L-アスパラギナーゼ)が挙げられるが、これらに限定されない(Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第9版、pp. 1227 - 1229を参照のこと)。

**【0093】**

任意の抗精神病剤が、本発明の方法で使用され得る。抗精神病剤の非限定的な例としては、クロルプロマジン、ペルフェナジン、およびトリフルペラジン(trifluoperazine)が挙げられる。抗精神病剤の他の例は、Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第9版、pp. 440 - 420に見出され得る。

**【0094】**

任意の三環系抗鬱剤が、本発明の方法で使用され得る。三環系抗鬱剤の非限定的な例としては、クロリミプラミン(chlorimipramine)、アミトリプチリンおよびドキシペミンが挙げられる。抗精神病剤の他の例は、Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第9版、pp. 431 - 434に見出され得る。

**【0095】**

任意のインターフェロンが、本発明の方法で使用され得る。好ましくは、インターフェロンは、インターフェロン- $\alpha$ である。一実施形態において、インターフェロンは、ヒトインターフェロン- $\alpha$ である。インターフェロン- $\alpha$ を製造する方法は、米国特許第6,005,075号;同第5,834,235号;同第5,503,828号;および同第4,820,638号に見出され得る。

**【0096】**

任意のインターロイキンが、本発明の方法で使用され得る。好ましくは、インターロイキンは、インターロイキン-2である。一実施形態において、インターロイキンは、ヒトインターロイキン-2である。インターロイキン-2を製造する方法は、米国特許第5,834,441号;同第5,795,777号;同第5,419,899号;および同第5,399,699号に見出され得る。

**【0097】**

任意の抗感染剤が、本発明の方法で使用され得る。好ましくは、抗感染剤は、エメチンである。抗感染剤の他の例は、Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第9版、pp. 965 - 1008に見出される。

**【0098】**

ニューレギュリン剤は、インビボで投与され得る(すなわち、哺乳動物に直接投与される)。あるいは、ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸が、エキソビボで投与され得る(すなわち、細胞、組織または器官に投与される。ここで、ニュー

10

20

30

40

50

レギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸を有するこのような細胞、組織または器官が、哺乳動物に移入され得る)。

【0099】

(E. 心筋梗塞の処置)

1つの局面において、本発明は、有効量のニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、あるいはこのニューレギュリンの生成および/または機能を増大する薬剤、ならびに心筋梗塞のための有効量の予防剤または治療剤を含む組合わせに関する。好ましくは、本発明の組合わせは、薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤をさらに含む。

10

【0100】

任意の適切なニューレギュリンが、本発明の組み合わせで使用され得る。例えば、本発明の組み合わせで使用されるニューレギュリンは、Er b B 2レセプター~Er b B 4レセプターとの結合によってその抗心筋梗塞活性を実行し得る。別の例において、本発明の組合せで使用されるニューレギュリンは、ニューレギュリン1、ニューレギュリン2、ニューレギュリン3またはニューレギュリン4である。好ましくは、ニューレギュリン2は、ニューレギュリン 2またはニューレギュリン 2である。さらに別の例において、本発明の組合せで使用されるニューレギュリンは、配列番号4で示されるアミノ酸配列を含むニューレギュリン 2フラグメントである。上記の章で記載される任意の特定のニューレギュリンもまた使用され得る。

20

【0101】

任意の適切な予防剤または治療剤が、本発明の組み合わせで使用され得る。例えば、本発明の組み合わせで使用される予防剤または治療剤は、アンジオテンシンI-変換酵素インヒビター(ACEI)、カルシウムアンタゴニスト、 $\alpha$ -レセプターアンタゴニスト、アスピリン、アトロピン、ニトログリセリン、スコポラミンまたは血栓溶解剤であり得る。

【0102】

任意の適切なACEIが使用され得る。例示的なACEIとしては、カプトプリル、ラムプリル(rampril)、リシノプリル、ゾフェノプリル(zofenopril)およびトランドラプリル(trandolapril)が挙げられる。任意の適切なカルシウムアンタゴニストが使用され得る。例示的なカルシウムアンタゴニストとしては、ジルチアゼムが挙げられる。任意の適切な $\alpha$ -レセプターアンタゴニストが使用され得る。例示的な $\alpha$ -レセプターアンタゴニストとしては、プロプラノロール、メトプロロール、アテノロールおよびチモロールが挙げられる。任意の適切な血栓溶解剤が使用され得る。代表的な血栓溶解剤としては、ストレプトキナーゼ、t-PAおよびアニストレプラゼ(anistreplase)が挙げられる。

30

【0103】

別の局面において、本発明は、キットに関し、このキットは、容器中の上記の組み合わせ、および心筋梗塞を予防、処置または遅延する際にこの組合せを使用するための指示書を備える。

40

【0104】

さらに別の局面において、本発明は、哺乳動物における心筋梗塞を予防、処置または遅延するための方法に関し、この方法は、このような予防、処置または遅延が必要であるかまたは所望される哺乳動物に、有効量のニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、あるいはこのニューレギュリンの生成および/または機能を増大する薬剤を投与し、それによりこの心筋梗塞を予防、処置または遅延する工程を包含する。

【0105】

任意の適切なニューレギュリンが、本発明の方法で使用され得る。例えば、本発明の方

50

法で使用されるニューレギュリンは、E r b B 2レセプター～E r b B 4レセプターとの結合によってその抗心筋梗塞活性を実行し得る。別の例において、本発明の方法で使用されるニューレギュリンは、ニューレギュリン1、ニューレギュリン2、ニューレギュリン3またはニューレギュリン4である。好ましくは、ニューレギュリン1は、ニューレギュリン2またはニューレギュリン2である。さらに別の例において、本発明の方法で使用されるニューレギュリンは、配列番号4で示されるアミノ酸配列を含むニューレギュリン2フラグメントである。上記の章で記載される任意の特定のニューレギュリンもまた使用され得る。

**【0106】**

特定の実施形態において、ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、またはこのニューレギュリンの生成および/または機能を増大する薬剤が、心筋梗塞に関連する左心室拡張終末期径(L V E D D)および左心室収縮終末期径(L V E S D)の増加に拮抗する。別の特定の実施形態において、ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、またはこのニューレギュリンの生成および/または機能を増大する薬剤は、心筋梗塞に関連する左心室EFの減少に拮抗する。

10

**【0107】**

本発明の方法は、任意の適切な哺乳動物における心筋梗塞を予防、処置または遅延するために使用され得る。代表的な哺乳動物としては、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、雌ウシ、雄ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、サルおよび他の非ヒト霊長類が挙げられる。好ましくは、本発明の方法は、ヒトにおける心筋梗塞を予防、処置または遅延するために使用される。

20

**【0108】**

本発明の方法は、任意の適切な心筋梗塞を予防、処置または遅延するために使用され得る。例えば、本発明の方法は、左心室拡大、減少した収縮機能および増加した充填圧からなる群から選択される臨床的特徴を有する心筋梗塞を予防、処置または遅延するために使用され得る。

**【0109】**

ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、あるいはこのニューレギュリンの生成および/または機能を増大する薬剤が、単独で投与され得る。好ましくは、ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、あるいはこのニューレギュリンの生成および/または機能を増大する薬剤が、薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤と共に投与される。特定の実施形態において、ニューレギュリタンパク質またはその機能的フラグメントが投与される。別の実施形態において、ニューレギュリタンパク質またはその機能的フラグメントをコードする核酸が、投与される。任意の適切な投与経路が使用され得る。好ましくは、静脈内投与が使用される。

30

**【0110】**

本発明の方法は、心筋梗塞のための予防剤または治療剤を投与する工程をさらに包含する。任意の適切な予防剤または治療剤が、本発明の方法で使用され得る。例えば、本発明の方法で使用される予防剤または治療剤は、アンジオテンシンI変換酵素インヒビター(ACEI)、カルシウムアンタゴニスト、 $\alpha$ -レセプターアンタゴニスト、アスピリン、アトロピン、ニトログリセリン、スコポラミンまたは血栓溶解剤であり得る。

40

**【0111】**

任意の適切なACEIが使用され得る。例示的なACEIとしては、カプトプリル、ラムプリル、リシノプリル、ゾフェノプリルおよびトランドラプリルが挙げられる。任意の適切なカルシウムアンタゴニストが使用され得る。例示的なカルシウムアンタゴニストとしては、ジルチアゼムが挙げられる。任意の適切な $\alpha$ -レセプターアンタゴニストが使用

50

され得る。例示的な - レセプターアンタゴニストとしては、プロパラノロール、メトプロロール、アテノロールおよびチモロールが挙げられる。任意の適切な血栓溶解剤が使用され得る。例示的な血栓溶解剤としては、ストレプトキナーゼ、t - P A およびアニストレプラーゼが挙げられる。

【0112】

好ましい実施形態において、ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、またはこのニューレギュリンの生成および/または機能を増大する薬剤が、インビボで投与される。

【0113】

(F. 好ましい安全用量および/レジメンを有する薬学的組成物)

1つの局面において、本発明は、哺乳動物における疾患を予防、処置または遅延するための薬学的組成物に関し、この組成物は、ニューレギュリタンパク質またはその機能的フラグメントを、a) 約170 U / kg 以下の安全用量; またはb) 約3,600 U / kg 以下の全レジメン中に含む。

【0114】

本発明の薬学的組成物は、任意の適切なレジメンおよび/または投与計画において使用され得る。一例において、本発明の薬学的組成物は、約21日以下の間投与される。別の例において、本発明の薬学的組成物は、連続的または断続的に投与される。

【0115】

本発明の薬学的組成物は、単独で投与され得る。好ましくは、本発明の薬学的組成物は、薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤をさらに含む。

【0116】

任意の適切なニューレギュリンが、本発明の薬学的組成物に使用され得る。例えば、本発明の薬学的組成物に使用されるニューレギュリンは、Erbb2レセプター~Erbb4レセプターとの結合によって、その抗疾患活性を実行し得る。別の例において、本発明の薬学的組成物で使用されるニューレギュリンは、ニューレギュリン1、ニューレギュリン2、ニューレギュリン3またはニューレギュリン4である。好ましくは、ニューレギュリン1は、ニューレギュリン 2またはニューレギュリン 2である。さらに別の例において、本発明の薬学的組成物で使用されるニューレギュリンは、配列番号4で示されるアミノ酸配列を含むニューレギュリン 2フラグメントである。上記の章で記載される任意の特定のニューレギュリンもまた使用され得る。

【0117】

本発明の薬学的組成物は、任意の適切な哺乳動物における疾患を予防、処置または遅延させるために使用され得る。例示的な哺乳動物としては、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、雌ウシ、雄ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、サルおよび他の非ヒト霊長類動物が挙げられる。好ましくは、本発明の方法は、ヒトにおける疾患を予防、処置または遅延させるために使用される。

【0118】

本発明の薬学的組成物は、任意の適切な疾患を予防、処置または遅延させるために使用され得る。好ましくは、本発明の薬学的組成物は、心臓血管疾患(例えば、ウイルス性心筋炎、DCM、心臓毒性活性、心筋梗塞活性など)を予防、処置または遅延させるために使用される。

【0119】

好ましい実施形態において、本発明の薬学的組成物は、静脈内投与のために処方される。

【0120】

以下は、ニューレギュリンと細胞表面Erbb3/Erbb4分子およびErbb2タンパク質リン酸化の間接的媒介とを組み合わせることによって、NRG-1の生物学的活性の決定のための例示的な迅速、感受性、高流量かつ定量的方法である(例えば、Mic

10

20

30

40

50

h a e l D . S a d i c k r a A n a l y t i c a l B i o c h e m i s t r y , 1 9 9 6 , 2 3 5 , 2 0 7 - 2 1 4 を参照のこと)。Michael D. Sadickらに記載されるインビトロNRG-1活性決定の実施例3に従って、種々の起源のNGR-1生物学的活性が決定され得る。

#### 【0121】

簡単に述べると、このアッセイ（キナーゼレセプター活性酵素結合免疫吸着アッセイ（KIRA-ELISA）と呼ばれる）は、2つの別々のマイクロタイタープレートからなり、一方は、細胞培養、リガンド刺激、および細胞溶解/レセプター可溶化のためであり、そして他方のプレートは、レセプター捕捉およびホスホチロシンELISAのためである。このアッセイは、ヘレグリン（heregulin）誘導ErbB2活性の分析のために開発され、接着乳癌細胞株（MCF-7）に対するインタクトなレセプターの刺激を利用する。膜タンパク質は、Triton X-100溶解を介して可溶化され、そしてこのレセプターは、ErbB3またはErbB4への交差反応無しで、ErbB2特異的抗体でコーティングされたELISAで捕捉される。次いで、レセプターリン酸化の程度は、抗ホスホチロシンELISAによって定量化される。再生可能な標準曲線は、ヘレグリン1（177-244）（HRG1（177-244））について約360pMのEC（50）で生成される。HRG1（177-244）の同一のサンプルがKIRA-ELISAと定量的抗ホスホチロシンウェスタンブロット分析の両方によって分析される場合、この結果は、互いに非常に密接した関係にある。この報告に記載されるアッセイは、HRGとErbB3および/またはErbB4との相互作用から生じるErbB2のチロシンリン酸化を特異的に定量化することが可能である。

10

20

#### 【0122】

遺伝的に操作された医薬の大部分がタンパク質およびポリペプチドであるので、それらの活性は、それらのアミノ酸配列またはそれらの空間的構造によって形成される活性中心によって決定され得る。タンパク質およびポリペプチドの活性力価は、それらの絶対的な品質と一致せず、従って、化学薬物の活性力価のように重量単位を用いて決定できない。しかし、遺伝的に操作された医薬の生物学的活性は、一般的にそれらの薬力学と一致し、そして所定の生物学的活性を介して確立された力価決定系は、その力価単位を決定し得る。従って、生物学的活性決定は、生物学的活性を有する物質を力価決定するプロセスの一部であり得、そして遺伝的に操作された産物の品質制御の重要な成分である。遺伝的に操作された産物および臨床的に使用された薬物の品質制御の生物学的活性の基準を決定することは、重要である。

30

#### 【0123】

最大反応の50%を誘導し得る標準産物の量は、活性単位（1U）として規定される。従って、異なる薬物および異なるバッチ数からの産物は、均一な基準で定量化され得る。

#### 【0124】

（G. ニューレギュリンの処方、用量および投与の経路）

ニューレギュリンタンパク質、もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリンタンパク質をコードする核酸、もしくはその機能的フラグメントの処方、用量および投与の経路（好ましくは、薬学的組成物の形態）は、当該分野で公知の方法に従って決定され得る（例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro (Editor) Mack Publishing Company, April 1997; Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems, Banga, 1999; および Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, Hovgaard and Frkjr (Ed.), Taylor & Francis, Inc., 2000; Medical Applications of Liposomes, Lasic and Papahadjopoulos (Ed.), Elsevier Sci

40

50

ence, 1998; Textbook of Gene Therapy, Jain, Hogrefe & Huber Publishers, 1998; Adenoviruses: Basic Biology to Gene Therapy, Vol. 15, Seth, Landes Bioscience, 1999; Biopharmaceutical Drug Design and Development, Wu-Pong and Rojanasakul (Ed.), Humana Press, 1999; Therapeutic Angiogenesis: From Basic Science to the Clinic, Vol. 28, Dolež (Ed.), Springer-Verlag New York, 1999を参照のこと)。ニューレギュリタンパク質、もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質をコードする核酸、もしくはその機能的フラグメントは、経口、直腸、局所、吸入、頬（例えば、舌下）、非経口（例えば、皮下、筋肉内、皮内、または静脈内）、経皮の投与または任意の他の適切な投与経路のために処方され得る。任意の所定の場合において、大部分の適切な経路は、処置される状態の性質および重篤度、ならびに使用されている、特定のニューレギュリタンパク質、もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質をコードする核酸、もしくはその機能的フラグメントの性質に依存する。

#### 【0125】

ニューレギュリタンパク質、もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質をコードする核酸、もしくはその機能的フラグメントは、単独で投与され得る。代替的に、好ましくは、ニューレギュリタンパク質、もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質をコードする核酸、もしくはその機能的フラグメントは、薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤と同時に投与される。任意の適切な薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤は、本発明の方法において使用され得る（例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Alfonso R. Gennaro (Editor) Mack Publishing Company, April 1997を参照のこと）。

#### 【0126】

ニューレギュリタンパク質をコードする核酸またはその機能的フラグメントは、遺伝子送達システムの成分として、裸のDNA、複合体化DNA、cDNA、プラスミドDNA、RNAまたは他のそれらの混合物の形態で使用され得る。別の実施形態において、ニューレギュリタンパク質をコードする核酸またはその機能的フラグメントは、ウイルスベクター内に含まれる。遺伝子治療に適切な任意のウイルスベクターが使用され得る。例えば、アデノウイルスベクター（米国特許第5,869,305号）、シミアンウイルスベクター（米国特許第5,962,274号）、条件付き複製ヒト免疫欠損ウイルスベクター（米国特許第5,888,767号）、レトロウイルス、SV40、単純ヘルペスウイルスアンプリコンベクターおよびワクシニアウイルスベクターが使用され得る。さらに、遺伝子は、非ウイルスベクター系（例えば、リポソーム）内に送達され得、ここで、この脂質は、凝固の間、酸化からDNAまたは他の生体材料を保護する。

#### 【0127】

本発明に従って、ニューレギュリタンパク質、もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質をコードする核酸、もしくはその機能的フラグメントは、単独でまたは他の薬剤、キャリアまたは賦形剤とともに、任意の適切な投与経路（例えば、海綿質内（intracavernous）注射、皮下注射、静脈内注射、筋肉内注射、皮内注射、経口投与または局所投与）のために処方され得る。この方法は、添加された保存剤とともに、単位投薬形態で、アンプルで、または多用量容器で、注射可能投与のための処方物を使用し得る。処方物は、オイルまたは水性のビヒクル中の懸濁液、溶液またはエマルジョンのような形態を取り得、そして懸濁剤、安定化剤および/または分散剤のような処方剤を含み得る。あるいは、活性成分は、使用前に適切なビヒクル、滅菌性の発熱物質を含まない水または他の溶媒で、構成するための粉末形態であり得る。本発明の

局所投与は、泡状物、ゲル、クリーム、軟膏、経皮パッチ、またはペーストの使用を利用し得る。

【0128】

薬学的に受容可能な組成物および本発明における使用のために利用され得るそれらの投与のための方法としては、米国特許第5,736,154号；同第6,197,801B1号；同第5,741,511号；同第5,886,039号；同第5,941,868号；同第6,258,374B1号；および同第5,686,102号に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0129】

処置または予防における治療的用量の大きさは、処置される状態の重篤度および投与経路とともに変化する。用量、およびおそらく用量頻度はまた、個々の患者の年齢、体重、状態および応答に従って変化する。 10

【0130】

主治医が、毒性または副作用に起因して、治療を終了するか、中断するか、または低い用量に調節するための方法および時期を知ることが注意されるべきである。逆に、医師はまた、臨床的応答が、適切でない場合、処置をより高いレベルに調節する方法および時期を知る（毒性の副作用を排除する）。

【0131】

任意の適切な投与経路が使用され得る。投薬形態としては、錠剤、トローチ剤、カシエ剤、分散物、懸濁液、溶液、カプセル剤、パッチなどが挙げられる。Remington's Pharmaceutical Sciencesを参照のこと。 20

【0132】

実際の使用において、ニューレギュリタンパク質、もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質をコードする核酸、もしくはその機能的フラグメントは、単独でまたは他の薬剤とともに、従来の薬学的調合技術に従って、薬学的キャリアまたは賦形剤（例えば、 $\beta$ -シクロデキストリンおよび2-ヒドロキシ-プロピル- $\beta$ -シクロデキストリン）との完全な混合物中の活性物として組み合わせられ得る。キャリアは、局所的または非経口的な投与のために所望される幅広い形態の調製物を取り得る。非経口投薬形態（例えば、静脈内注射または注入）のための組成物を調製する際に、類似の薬学的媒体（水、グリコール、オイル、緩衝液、糖、保存剤、リポソームおよび当業者に公 30  
知なもの）が使用され得る。このような非経口組成物の例としては、デキストロース5% w/v、生理食塩水または他の液体が挙げられるが、これらに限定されない。ニューレギュリタンパク質、もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質をコードする核酸、もしくはその機能的フラグメントの合計用量は、単独でまたは投与される他の薬剤とともに、約1ml~2000mlの範囲の静脈内流体のバイアルで投与され得る。希釈流体の容量は、投与される合計用量に従って変化する。

【0133】

本発明はまた、本発明の治療レジメンを実施するためのキットを提供する。このようなキットは、薬学的に受容可能な形態で、ニューレギュリタンパク質、もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質をコードする核酸、もしくはその機 40  
能的フラグメントを、単独でまたは他の薬剤との組合せの治療有効量を1つ以上の容器に、含む。好ましい薬学的形態は、滅菌生理食塩水、デキストロース溶液、または緩衝溶液、あるいは他の薬学的に受容可能な滅菌流体との組合せである。あるいは、この組成物は、凍結乾燥され得るかまたは乾燥（desiccated）され得；この場合、キットは、必要に応じて、容器中に、複合体を再構成して、注射目的のために溶液を形成するために、薬学的に受容可能な溶液（好ましくは、滅菌）をさらに含む。例示的な薬学的に受容可能な溶液は、生理食塩水およびデキストロース溶液である。

【0134】

別の実施形態において、本発明のキットは、さらに、組成物を注射するために、好ましくは、滅菌形態で包装された針またはシリンジ、および/または包装されたアルコールパ 50

ッドを備える。説明書は、必要に応じて、医師または患者による組成物の投与のために含まれる。

【実施例】

【0135】

(H. 実施例)

本発明者らによって開発された組換えヒトニューレギュリン-1 S<sub>177</sub>-Q<sub>237</sub> (ニューレギュリン-1のrhNRG-1<sub>177</sub>-Q<sub>237</sub>)は、損傷した心筋細胞構造を修復し得、これらの細胞間の接続を強化し得、心筋機能を改善し得、そして心筋の生物学的効果を強化し得る。本明細書中に記載される実験は、特定のニューレギュリンフラグメント(例えば、rhNRG-1<sub>177</sub>-Q<sub>237</sub>)が、心臓血管疾患(例えば、ウイルス性心筋炎または拡張型(または鬱血型)心筋症(DCM))、特定の治療剤によって引き起こされる心臓毒性、またはインビボでの心筋梗塞の種々の形態を有効に処置し得、そして正常な動物の血行力学に影響しない。

10

【0136】

(実施例1. rhNRG-1<sub>177</sub>-Q<sub>237</sub>の組換え産生)

図1。操作された株の構築物の技術的概要

ヒトニューレギュリン遺伝子は、約13エキソンとともに染色体8P12内に位置する。組換えニューレギュリンフラグメントは、61アミノ酸から構成される。理論分子量は、7,055Dである。SDS-PAGE電気泳動における見かけの分子量は、6,500~7,000Dである。その等電点は、約6.5である。グリコシル化された遺伝子座は存在しない。ペプチド構造は、3つのジスルフィド結合を含む。この遺伝子は、E. coliにおける発現に適切である。

20

【0137】

PET22bは、発現プラスミドとして選択された。ヒトニューレギュリン遺伝子は、プラスミド内に導入され、次いで、E. coli BL21は、このプラスミドによって形質転換された。高レベルの発現組換え体は、組換えヒトニューレギュリンフラグメントを産生するために操作された株としてスクリーニングされた。

【0138】

図2。ヒトニューレギュリン遺伝子の増幅

全RNAおよびmRNAは、5ヶ月のヒト胎児の脳組織から抽出され、そしてcDNAに逆転写される。RT-PCRは、標的遺伝子を増幅するために、テンプレートとして転写されたcDNAおよび一対のプライマー

30

【0139】

【化4】

P1, TCG AAC ATA TGA GCC ATC TTG TAA AAT GTG CGG (配列番号

1) および P2, TCG AAG GGC CCT CAC TGG TAC AGC TCC TCC (配列番号 2)

を用いて実施した。PCR産物を、1.5%アガロースにおいて電気泳動で調べた。特定の183bpDNAフラグメントを、アガロースにおいて見出し、その長さは、予期された長さと同じであった。

40

【0140】

図3。プラスミドPET22bの物理的マップ

図4。エンドヌクレアーゼ消化による組換えプラスミドの同定

塩化カルシウム沈降法を、発現プラスミドPET22b内へヒトニューレギュリン遺伝子をクローニングするために適用して、組換えヒトニューレギュリン発現プラスミド(PET22b-ヒトニューレギュリン)を構築した。この遺伝子は、T7プロモーターの駆動下で有効に発現された。発現遺伝子のN末端は、NdeI遺伝子座に挿入された。C末端ターミネーターは、最後のアミノ酸の隣である。発現されたタンパク質は、任意のアミノ酸との融合タンパク質を形成しなかった。正確な183bpのフラグメントは、エンドヌクレアーゼ消化分析後に得られた。形質転換体は、エンドヌクレアーゼ消化によって特

50

徴付けられた。二本鎖DNAを、配列分析のために抽出された。配列決定の結果は、発現ベクター内に含まれるヒトニューレギュリンの配列が、完全に正確であったことを確認した。決定されたcDNA配列を、ここに列挙する：

【0141】

【化5】

AGCCATCTTGTA AAA TGT GCG GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT GGA  
GGG GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAC CCC TCG AGA TAC TTG TGC  
AAG TGC CCA AAT GAG TTT ACT GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC GTA ATG GCC  
AGC TTC TAC AAG GCG GAG GAG CTG TAC CAG (配列番号3)

10

上記cDNAに基づく推定アミノ酸配列は、以下：

【0142】

【化6】

SHLVKCAEKEKTFVCVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRQCQNYVMASFYKAEEL

YQ(配列番号4)

である。

【0143】

図5。操作された株の発現についてのスクリーニング

PCR増幅およびエンドヌクレアーゼ消化分析の後に、操作されたクローン(BL21-22b-ヒト-ニューレギュリン)の単一コロニーを、無作為に取り出し、2mlのLB-Amp液体培地中に播種した。培養物を37°Cで一晩インキュベートし、そして250rpmで振盪した。次いで、純粋な培養物の割合は、20mlのLB-Amp培地中に播種された。培養物は、37°Cでインキュベーション後、混濁がOD<sub>600</sub>で1.0に増加するまで、IPTGを4時間加えて、発現を誘導した後に、収集された。封入体は、細胞を破壊した後に、収集された。15%SDS-PAGEにおける電気泳動、薄層走査分析、ウェスタンブロッティング、および反復されたスクリーニングの後に、操作された株(BL21-22b-ヒト-ニューレギュリン)を特徴付け、標的タンパク質ニューレギュリンの安定高レベル発現を確立した。発現された標的タンパク質は、この株における全タンパク質の約10%を占めた。高圧力ホモジネートプロセスの後に、標的タンパク質は、封入体の形態で存在した。

20

30

【0144】

操作された株を、IPTGによる4時間の誘導後、SDS-PAGE電気泳動によって分析した。封入体は、全タンパク質の約20%を占めた。精製された組換えニューレギュリン特異的活性は、 $5 \times 10^3$  EU/mgを超え、ニューレギュリン産生株の構築が成功したことを示した。SDS-PAGE、ウェスタンブロット、株スクリーニングの段階における生物学的活性分析に加えて、さらなる分析(例えば、ニューレギュリンアミノ酸組成物分析およびN末端配列分析)が実施された。これらの結果は、発現された組換えヒトニューレギュリンのアミノ酸配列が、設計されたものと同じであることを示す。

(実施例2. 冠状動脈の結紮によって引き起こされるラットにおける心不全に対する組換えヒトニューレギュリン(Neuregulin)の治療効果)

40

(1. 要約)

(目的) 冠状動脈の結紮によって引き起こされるラットにおける心不全に対する組換えヒトニューレギュリン-1(rhNRG-1)の治療効果を研究すること。(方法) ラットを開胸し、環状脈の下行枝を左心耳と肺動脈円錐との間の部位で非侵襲性縫合糸で結紮し、垂急性心不全ラットモデルを準備した。一般的に、結紮の約6日後、左心室の駆出率は約50%まで低下した。これらの群を無作為(すなわち、モデル群、試験薬物群(testing drug group)、および偽手術(偽操作)群(開胸のみで冠状動脈を結紮しなかった)に分けた。各群には10~13の動物が存在し、3つの投薬レベルの群を試験薬物群について設定した(投薬レベルは、それぞれ、5、10および20μg

50

／kgであった)。薬物を、1日1回、連続10日間、尾部の静脈に注射した。心機能の決定(心エコー検査)を、薬物の投与の6日前および薬物の投与中止の後に実施し、試験マウスを、剖検し、心臓の重量を量り、心室壁の厚みを決定し、病理学的検査および血漿中のレニン-アンジオテンシン-アルドステロンレベルを決定した。(結果)3つの投薬レベルのrhNRG-1の連続5日の薬物投与後、動物モデルの駆出率(71.1±12.0%、64.4±12.9%、62.9±8.4%)および動物モデルの短縮率(36.9±9.7%、32.0±9.5%、30.3±6.1%)は、全て増加し、動物モデル群と比較して、20μg/kg群と、10μg/kg群との間に有意差があった(P<0.01);さらに、20μg/kgモデル群の駆出率の変化は、薬物投与の約35日後まで維持され(P<0.05);rhNRG-Iの20μg/kgは、心筋の虚血領域を有意に減少させ、繊維性病変の毛細血管数を増加させ(P<0.05);rhNRG-1の20μg/kgおよび10μg/kgは、末梢のアンジオテンシンI(AI)、アンジオテンシンII(AII)、レニン(PRA)およびアルドステロン(ALD)のレベルを低下させ、これはモデル群と比べた場合に有意差があった(P<0.01、P<0.05)。連続10日の注入と連続5日の注入との間には有意差はなかった(P<0.05)。(結論)特定の用量のrhNRG-1を連続5日の静脈注入すると、冠状動脈の結紮によって生じたラットにおける心不全を効果的に処理し得る。

10

## (2. 実験の目的)

冠状動脈の結紮によって生じたラットにおける心不全について、rhNRG-1の治療効果を研究すること。

20

## (3. 試験薬物)

rhNRG-Iを、Zensun(Shanghai)Science & Technology Co Ltd、ロット番号:200110006-2;濃度:500μg/アンプル;力価決定:5000u/アンプル;純度:>95%(HPLC-C8)を調査し、産生した。

## (4. 実験動物)

4.1 種、供給源および適応性証明数(number of certificate of competency):SDラット(Experimental Animal Center of Chinese Academy of Scienceにより提供)、適応性証明数:Zhong Ke Yuan Dong Guan Hui

30

003;

4.2 体重、性別:200~220g、雄性

## (5. 試薬および設備)

5.1 心エコーデバイス、Hewlett Packard Sonos 5500、プローブ型:S12;

5.2 6誘導電子生理レコーダーを指導する(Six leads electro-physiology recorder)、SMUP-C-6、Shanghai医科大学の生理学部によって製造された;

5.3 電子バランス、Materlert-Tolido設備(Shanghai)Co Ltd;

40

5.4 冠状静脈留置ニードル、20G、Sino-America Weng Zhou Hua Li Medical Equipment Companyによって製造された;

5.5 微小副尺付きカリパス(Micro-vernier calipers)、Harbin Measure & Knife Factory;

5.6 放射性-免疫係数器(Radio-immune counter)、GC-1200、Zhong Jia Photoelectric Equipment Branch of General Science & Technology Industry Company of China Science & Technology University;

50

5.7 レニン、アンジオテンシンキット、A I : B e i j i n g N o r t h B i o - T e c h I n s t i t u t e、ロット番号：0210；  
 全て：B e i j i n g N o r t h B i o - T e c h I n s t i t u t e、ロット番号：2028；

5.8 脱毛剤、8%硫酸ナトリウム、X i L o n g C h e m i c a l P l a n t o f G u a n g D o n g P r o v i n c e、ロット番号：010622；

5.9 塩酸ケタミン、S h a n g h a i Z h o n g X i P h a r m a c e u t i c a l s C o L t dによって製造された、ロット番号：20020401。

## (6. 実験方法)

### 6.1 実験群

偽手術（偽操作）群、モデル群および試験薬物群を準備した。

10

#### 【0145】

偽手術（偽操作）群（ $n = 10$ ）（すなわち、冠状動脈を結紮しない開胸術）；モデル群（ネガティブコントロール群）（ $n = 12$ ）：調製物のビヒクルを注入した（10 mM PB, 0.2% ヒト血清アルブミン, 5% マンニトール）；試験薬物群（ $n = 13$ ）：r h N R G - 1（3つの投薬レベル）、2亜群を各投薬レベル群について設定した；1つの群を、薬物投与後の長期間のモニタリングに使用した。

6.2 試験薬物および薬物調製物の投薬準備、投薬経路、注入時間、投薬される濃度および容積。投薬レベル群（高（ $20 \mu\text{g} / \text{kg}$ ）、中（ $10 \mu\text{g} / \text{kg}$ ）、低（ $5 \mu\text{g} / \text{kg}$ ））を、予備実験の結果によって設定した。薬物を、調製緩衝溶液（10 mM PB、0.2% ヒト血清アルブミン、5% マンニトール）で必要な濃度に希釈した

20

薬物投与経路：試験薬物群とモデル群の両方において、薬物を、尾部静脈に連続5日の間、1日1回注入した。心エコー検査を薬物投与の6日前に実施し、次いで、5日間にわたって連続的に注入した。各薬物注入の容積は、 $0.4 \text{ ml} / 100 \text{ g}$  体重であった。

#### 【0146】

### 6.3 実験方法

#### 6.3.1 冠状動脈の前下行枝の結紮によって心不全ラットモデルを準備する

$100 \text{ mg} / \text{kg}$  ケタミンの腹腔内投与での麻酔後、ラットを仰臥位に固定し、除毛後、プロモ-ゲラミン（b r o m o - g e r a m i n e）で頸部領域を消毒した。正中切開し、前頸部筋肉組織を分離した後に気管を見出し、18Gの動脈留置套管針（t r o c h a r）を、3~5気管軟骨のレベルで気管に注入し、スタイレットを取り出し、プラスチックカニユーレを1~2cm気管にさらに挿入し、小さな動物については、後でベンチレータと接続するために固定した（換気堆積は約20 ml、頻度は80/minである）。左前胸壁皮膚を開いた後、筋肉を分離し、4番目および5番目の肋骨を露出させ、カーブ鉗子で胸壁を貫通し、肋骨下の組織を分離し、ベンチレータと接続し、心臓を露出させ、肺の拡張および心拍をモニタリングし、心膜を裂き、上方の脂肪パッド（f a t p a d）を上向きにし、左耳介および肺円錐体を完全に露出し、医学的使用の間、2つの部分の間で左冠状動脈を6/0非侵襲性縫合糸で結紮した。梗塞を起こした心筋領域（約 $8 \text{ mm} \times 8 \text{ mm}$ ）は、紫色になり、結紮後、著しく有意に減少した活性を示した。次いで、胸壁を閉じ、肺を膨張させるためにベンチレータの開口を遮断し、空気を追い出すように胸部を強く押し、次いで、胸筋および皮膚を縫合した。呼吸をモニタリングし、自発的な呼吸が回復した後、ベンチレータを取り外し、飼育のために動物をケージに戻した。偽手術（偽操作）群では、冠状動脈の結紮はせず、心膜を裂いて開いただけである。手術したラットに、手術の約6日後に心エコー検査を実施した。EF値が約50%低下した動物を、無作為に群分けし、各々の群のEF値を全て約50%にし、次いで薬物投与を始めた。

30

40

#### 【0147】

### 6.3.2 薬物動態実験

約50%のEF値を有する動物を、無作為にモデル群（ネガティブ群）および3つの投薬レベルの試験薬物群（各群12~13匹の動物）に、分けた。試験薬物群およびモデル群の薬物投薬経路は、尾部静脈への注入であり、連続5日間、1日1回であった。6日目

50

の心エコー検査後、もう5日の薬物連続投与を実施した。各注入用量は、 $0.4\text{ ml} / 100\text{ g}$  体重であった。

【0148】

心エコー検査を、薬物投与の終了後に再度実施し、これらの動物を剖検し、心臓重量を量り、心室壁の厚みを決定し、心臓の病理検査を実施し、末梢血を採取し、血漿を分離し、そしてレニン-アンジオテンシナルドステロンを測定した。

【0149】

種々の群のいくつかの試験動物を、長期モニタリングのために残した。

【0150】

6.3.3 観察指標

10

6.3.3.1 心機能の測定

心エコー検査を、結紮後であり、かつ薬物投与の前、薬物投与の6日後、薬物投与の1日後に、ケタミンを用いた麻酔下を実施した。主要な指標は、以下が挙げられる：

EF：心駆出率、心室の駆出機能を反映する；

FS：心室短軸短縮率、心室の収縮機能を反映する；

LVDd：左心室の拡張期最大内径（cm）；

LVDs：左心室の収縮期最小内径（cm）

6.3.3.2 血漿中のレニン-アンジオテンシン-アルドステロンの含有量の決定

これは、Fudan大学と提携したRadio-isotope Department of Zhong Shan Hospitalによって実施されたことを提示した。

20

【0151】

頸動脈瀉血を、試薬キットの指示に従って、実施して血漿を抽出し、凍結させ、そして-20で保存した。レニン活性（PRA）、アンジオテンシンI（AI）、アンジオテンシンII（AII）およびアルドステロン（ALD）の含有量を、免疫アッセイで決定した。

【0152】

6.3.3.3 心筋の病理組織学切片

Shanghai Difficult Pathologic Consulting CenterのWang Bing Seng教授が実施した。

30

【0153】

10%ホルムアルデヒドで固定した後、ラットの心筋を、長軸方向に同じ距離で3つのスライスに切断し、パラフィンに包埋して切片を作製し、HE染色し、心臓の線維性領域について画像分析し、線維性病巣における毛細血管数を数え（計数単位：標本/mm<sup>2</sup>）；Nagar-Oslen染色し、心筋における虚血性低酸素領域の大きさを研究した。

【0154】

（7. データ処理）

t検定を、収集された実験データについて実施した。

（8. 実験結果）

8.1 ラットの虚血性心臓の機能に対するrhNRG-1の効果

40

薬物投与の5日後に実施した心エコーの結果は、モデル群のEF値（ $50.2 \pm 8.4\%$ ）およびFS値（ $22.4 \pm 4.6\%$ ）は、偽手術（偽操作）群のEF（ $91.1 \pm 2.4\%$ ）およびFS（ $57.3 \pm 3.9\%$ ）よりも有意に低く、有意差がある（ $P < 0.01$ ）ことを示した。試験薬物群（20、10および $5\text{ }\mu\text{g} / \text{kg}$ ）のEF値（ $71.1 \pm 12.0\%$ 、 $64.3 \pm 12.8\%$ 、 $62.9 \pm 8.4\%$ ）とFS値（ $36.9 \pm 9.7\%$ 、 $32.0 \pm 9.5\%$ 、 $30.3 \pm 6.1\%$ ）の両方は、一旦有意に増加し、モデル群と比較した場合に有意差があった（ $P < 0.01$ ）。

【0155】

薬物10日後に繰り返した心エコー検査の結果は、EF値（ $42.7 \pm 6.4\%$ ）およびFS値（ $18.3 \pm 3.2\%$ ）が、偽手術（偽操作）群のEF（ $95.0 \pm 2.8\%$ ）

50

およびFS (65.3 ± 6.8%) よりも依然として有意に低く、有意差 (P < 0.01) があることを示した。試験薬物群 (20、10および5 μg/kg) のEF値 (75.7 ± 10.8%、61.4 ± 15.0%、59.2 ± 12.4%) およびFS値 (41.3 ± 11.0%、30.3 ± 10.4%、28.4 ± 8.6%) は、依然として相対的に高レベルで維持され、モデル群と比較した場合、有意差があった (P < 0.01)。しかし、薬物投与の5日目の結果と比べた場合、有意差はなかった。表1~6は、2つの実験の結果を示した。

【0156】

モデル動物群、ならびに薬物投与の5日後および薬物投与中止の35日後試験薬物群における、ラット心臓のEF値についての観察を実施し、その結果は、20 μg/kg rhNRG-1群のラット心臓EF値が、相対的に高レベルで安定に維持され、モデル動物群と比べた場合に、有意差 (P < 0.05) を有することを示した (表7)。(表1. 心不全モデル動物 (1) を生じる冠状動脈の前下行枝の結紮における、薬物投与前の心機能の測定パラメータ)

【0157】

【表1】

群	LVDd	LVDs	EF	FS
擬操群 (n=6)	0.572 ±0.033*	0.258 ±0.046**	89.5 ±4.4**	55.2 ±5.8**
モデル群 (n=12)	0.705 ±0.117	0.558 ±0.119	48.3 ±10.3	21.3 ±5.6
rhNRG-1β群 20μg/kg (n=13)	0.730 ±0.108	0.575 ±0.119	49.3 ±11.4	21.7 ±6.4
rhNRG-1β群 10μg/kg (n=13)	0.709 ±0.099	0.555 ±0.102	49.5 ±11.0	22.1 ±6.1
	0.761	0.596	49.3	22.0
rhNRG-1β群 5μg/kg (n=13)	0.761	0.596	49.3	22.0
rhNRG-1β群 5μg/kg (n=13)	±0.075	±0.092	±10.6	±5.9

\* P < 0.05、\*\* < 0.01、モデル動物群と比較した場合

(表2. 心不全モデル動物 (1) を生じる冠状動脈の前下行枝の結紮における、薬物投与5日後の心機能の測定パラメータ)

【0158】

【表 2】

群	薬物投与	LVDd	LVDs	EF	FS
	iv	0.549	0.234	91.1	57.3
擬操作群 (n=6)	qd×5	±0.046**	±0.027**	±2.4**	±3.9**
	iv	0.79	0.61	50.24	22.43
モデル群 (n=12)	qd×5	±0.08	±0.09	±8.41	±4.62
	iv	0.70	0.46	71.07	36.88
rhNRG-1β	iv	0.70	0.46	71.07	36.88
20μg/kg (n=13)	qd×5	±0.07**	±0.09**	±11.99**	±9.66**
	iv	0.71	0.51	64.35	32.01
rhNRG-1β	iv	0.71	0.51	64.35	32.01
10μg/kg (n=13)	qd×5	±0.05*	±0.09**	±12.85**	±9.54**
	iv	0.73	0.54	62.90	30.32
rhNRG-1β	iv	0.73	0.54	62.90	30.32
5μg/kg (n=11)	qd×5	±0.05*	±0.09*	±8.39**	±6.11**

10

\* P < 0.05、\*\* < 0.01、モデル動物群と比較した場合  
 (表 3 . 心不全モデル動物 (1) を生じる冠状動脈の前下行枝の結紮における、薬物投与  
 10日後の心機能の測定パラメータ)

【0159】

【表 3】

20

群	薬物投与	LVDd	LVDs	EF	FS
	iv	0.466	0.159	95.0	65.3
擬操作群 (n=6)	qd×10	±0.041**	±0.036**	±2.8**	±6.8**
	iv	0.8	0.7	42.7	18.3
モデル群 1 (n=10)	qd×10	±0.11	±0.11	±6.36	±3.19
	iv	0.6	0.5	75.7	41.3
	iv	0.6	0.5	75.7	41.3
rhNRG-1β	iv	0.6	0.5	75.7	41.3
20μg/kg (n=10)	iv	0.7	0.51	61.4	30.3
	qd×10	±0.12**	±0.14**	±10.78**	±10.98**
rhNRG-1β	qd×10	±0.07**	±0.14**	±15**	±10.36**
10μg/kg (n=10)	iv	0.72	0.55	59.2	28.4
	qd×10	±0.10*	±0.12*	±12.37**	±8.62**
rhNRG-1β	iv	0.72	0.55	59.2	28.4
5μg/kg (n=10)	qd×10	±0.10*	±0.12*	±12.37**	±8.62**

30

\* P < 0.05、\*\* < 0.01、モデル動物群と比較した場合  
 (表 4 . 心不全モデル動物 (II) を生じる冠状動脈の前下行枝の結紮における、薬物投与  
 10日後の心機能の測定パラメータ)

【0160】

【表 4】

群	LVDd	LVDs	EF	FS
擬操作群 (n=6)	0.544	0.215	93	60.8
	±0.071*	±0.053**	±2.9**	±5.2**
モデル群 (n=12)	0.66	0.52	46.98	20.85
	±0.10	±0.11	±14.17	±7.38
rhNRG-1 β 20 μg/kg (n=12)	0.74	0.56	52.29	23.89
	±0.12	±0.11	±12.87	±7.28
rhNRG-1 β 10 μg/kg (n=12)	0.64	0.49	51.67	23.27
	±0.11	±0.11	±11.92	±6.73
rhNRG-1 β 5 μg/kg (n=12)	0.66	0.51	50.81	22.83
	±0.11	±0.12	±12.55	±6.92

10

\* P < 0.05、\*\* < 0.01、モデル動物群と比較した場合  
 (表 5 . 心不全モデル動物 (II) を生じる冠状動脈の前下行枝の結紮における、薬物投与 5 日後の心機能の測定パラメータ)

【0161】

【表 5】

群	薬物投与	LVDd	LVDs	EF	FS
擬操作群 (n=6)	iv	0.553	0.215	93.1	61.4
	qdx5	±0.063**	±0.052**	±3.9**	±6.2**
モデル群 (n=10)	iv	0.87	0.74	38.00	16.35
	qdx5	±0.11	±0.14	±12.36	±5.55
rhNRG-1 β 20 μg/kg (n=9)	i.v	0.68	0.46	65.47	34.23
	qdx5	±0.11**	±0.17**	±20.48**	±15.42**
rhNRG-1 β 10 μg/kg (n=12)	iv	0.72	0.54	56.51	26.53
	qdx5	±0.13**	±0.14**	±12.68**	±8.48**
rhNRG-1 β 5 μg/kg (n=10)	iv	0.74	0.58	56.76	28.35
	qdx5	±0.11*	±0.18*	±16.10**	±10.64**

20

30

\* P < 0.05、\*\* < 0.01、モデル動物群と比較した場合  
 (表 6 . 心不全モデル動物 (II) を生じる冠状動脈の前下行枝の結紮における、薬物投与 10 日後の心機能の測定パラメータ)

【0162】

【表 6】

群	薬物投与	LVDd	LVDs	EF	FS
擬操作群 (n=6)	iv	0.539	0.204	93.8	62.2
	10qd	±0.015**	±0.017**	±1.6**	±3.6**
モデル群 (n=10)	iv	0.81	0.69	36.13	15.18
	10qd	±0.13	±0.13	±10.10	±5.01
rhNRG-1 β 20μg/kg (n=8)	iv	0.65	0.42	70.22	36.49
	10qd	±0.09**	±0.13**	±14.15**	±11.27**
rhNRG-1 β 10μg/kg (n=12)	iv	0.68	0.49	66.54	34.28
	10qd	±0.08**	±0.17**	±15.81**	±12.64**
rhNRG-1 β 5μg/kg (n=9)	iv	0.70	0.53	57.90	29.26
	10qd	±0.08*	±0.16*	±19.54**	±14.19*

\* P < 0.05、\*\* < 0.01、モデル動物群と比較した場合  
(表 7. モデル動物における薬物投与の 5 日目および薬物投与中止の 35 日後に測定した心機能の EF 値)

【0163】

【表 7】

	薬物投与前の結紮後	薬物投与 5 日後	薬物投与 5 日後および 投薬中止の 35 日後
rhNRG-1 β 20μg/kg	52.4±13.8	79.2±4.7*	73.0±20.3*
rhNRG-1 β 10μg/kg	52.2±12.8	77.3±11.6	63.8±23.8
rhNRG-1 β 5μg/kg	53.1±12.8	75.8±15.3	69.9±28.6
モデル群	53.0±12.6	62.6±16.7	52.5±29.9
擬操作群	94.4±3.7**	94.1±2.5**	95.1±2.3**

\* P < 0.05、\*\* < 0.01、モデル動物群と比較した場合

8.2 モデルラット心筋の病理組織学に対する rhNRG-1 の効果

8.2.1 モデル動物における心筋虚血および低酸素症の重傷度に対する rhNRG-1 の効果

Nagar-Oslen で染色した切片において、正常な心筋は淡黄色に染まるが、虚血性領域は、赤茶色に深く染まった。虚血性低酸素症は、この方法で分析および定量的試験および半定量的試験の比較がなされ得る。

【0164】

図 6 ~ 15 は、種々の試験群の病理組織学的変化を示した。モデル群の心筋は深い色に染まり、心筋の大きなパッチは赤色に染まるが、偽手術(偽操作)群の心筋は、赤色に染まった領域はなく、黄色に染まり; 20 μg/kg rhNRG-1 の赤色に染まった心筋細胞は、途切れた分布(punctuate distribution)を示し; 10 μg/kg および 5 μg/kg 群の赤色に染まった組織は、一様でない分布を示した。このことは、rhNRG-1 が、虚血性低酸素症損傷の重傷度を軽減し得ることを実証した。

【0165】

(8.2.2 モデルラットの虚血心筋の線維芽領域における毛細管再生に対する rhNRG-1 の効果)

種々の試験群の心筋組織における毛細管数の変化を、Leica 画像分析システムを用いて研究した。rhNRG-1 を用いた試験薬物群のモデル動物の心筋の線維性病変における毛細管数の増加が存在することが結果から明らかとなり、20 μg/kg の用量レ

10

20

30

40

50

ベルと、モデル群との間に有意差が存在し ( $P < 0.01$ )、 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  および  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$  の用量レベルの群と、モデル群との間には、統計的に差が見られず、このことは、高用量の rhNRG-1 ( $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) が、ラットにおける冠動脈の結紮後に、心筋の線維性病変における毛細管の増殖を促進し得ることを示す (表 8、図 16 および 17)。

【0166】

(表 8 モデル動物の心筋線維性領域における毛細管再生に対する rhNRG-1 の効果)

【0167】

【表 8】

群	薬物投与	毛細管の計数 (I)	毛細管の計数 (II)
擬操作群	iv qd x 10	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$
モデル群	iv qd x 10	$6.49 \pm 2.17$	$13.7 \pm 5.5$
rhNRG-1 $\beta$ $20 \mu\text{g}/\text{kg}$	iv qd x 10	$10.12 \pm 3.0^{**}$	$24.6 \pm 9.5^{**}$
rhNRG-1 $\beta$ $10 \mu\text{g}/\text{kg}$	iv qd x 10	$8.99 \pm 3.3$	$19.6 \pm 8.5$
rhNRG-1 $\beta$ $5 \mu\text{g}/\text{kg}$	iv qd x 10	$9.35 \pm 4.2$	$15.0 \pm 6.9$

\* \*  $P < 0.01$  (モデル群と比較した場合)

(8.3 モデル動物における血漿中レニン - アンジオテンシン - アルドステロンレベルに対する rhNRG-1 の効果)

血漿中のレニン (PRA)、アンジオテンシン I (AI)、アンジオテンシン II (AII)、およびアルドステロン (ALD) のレベルを、ラジオイムノアッセイを用いて、種々の試験薬物群において決定した。モデル動物群において、結果は、PRA、AI、AII および ALD がそれぞれ、 $3.506 \pm 1.78 \text{ ng}/\text{ml} \cdot \text{h}$ 、 $10.655 \pm 1.18 \text{ ng}/\text{ml}$ 、 $1366.38 \pm 577.33 \text{ pg}/\text{ml}$  および  $1.738 \pm 0.34 \text{ ng}/\text{ml}$  であったことを示した。擬操作群の結果 ( $1.315 \pm 0.96 \text{ ng}/\text{ml}$ 、 $8.125 \pm 1.57 \text{ ng}/\text{ml}$ 、 $564.37 \pm 273.56 \text{ pg}/\text{ml}$  および  $1.113 \pm 0.45 \text{ ng}/\text{ml}$ ) と比較すると、含量は有意に増加し、その差は統計的に有意であった ( $P < 0.05$ )。

【0168】

血漿中の AI ( $7.40 \pm 12.15 \text{ ng}/\text{ml}$ 、 $7.65 \pm 1.40 \text{ ng}/\text{ml}$ ) および AII ( $641.47 \pm 283.86 \text{ pg}/\text{ml}$ 、 $468.58 \pm 165.10 \text{ pg}/\text{ml}$ ) のレベルは、有意差 ( $P < 0.01$ ) を伴って、 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$  および  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  の rhNRG-1 群において有意に減少した。PRA ( $1.337 \pm 1.09 \text{ ng}/\text{ml} \cdot \text{h}$ 、 $1.075 \pm 1.50 \text{ ng}/\text{ml} \cdot \text{h}$ ) および ALD ( $1.02 \pm 0.27 \text{ ng}/\text{ml}$ 、 $1.26 \pm 0.38 \text{ ng}/\text{ml}$ ) もまた有意に減少し、モデル群のものと比較すると、有意差 ( $P < 0.05$ ) が存在した。しかし、擬操作群のものと比較すると、この差は統計的に意味を有さず ( $P > 0.05$ )、このことは、特定の用量レベルの rhNRG-1 が、その冠動脈を結紮した後に、ラットにおける血漿中の PRA、AI、AII および ALD の含量を減少し得ることを示す (表 9)。

【0169】

(表 9 種々の試験群モデル動物における、血漿中のレニン (PRA)、アンジオテンシン I (AI)、アンジオテンシン II (AII) およびアルドステロン (ALD))

【0170】

10

20

30

40

【表 9】

群	薬物投与	AI(ng/ml)	AI(Pg/ml)	ALD(ng/ml)	PRA(ng/ml·h)
擬操作群 n=6	iv	8.125	564.370	1.113	1.315
	qd×10	±1.573*	±273.56*	±0.447*	±0.96*
rhNRG-1β (n=6)	iv	10.655	1366.38	1.738	3.506
	qd×10	±1.178	±577.33	±0.337	±1.78
rhNRG-1β 20μg/kg (n=6)	iv	7.400	641.47	1.018	1.337
	qd×10	±2.15**	±283.86*	±0.266**	±1.09*
rhNRG-1β 10μg/kg (n=6)	iv	7.654	468.583	1.264	1.075
	qd×10	±1.399**	±165.1**	±0.382*	±1.5*
rhNRG-1β 5μg/kg (n=6)	iv	10.036	807.304	1.472	4.032
	qd×10	±2.283	±333.46	±0.413	±1.81

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  (モデル群と比較した場合)

(9. 結論)

モデルコントロール群の拍出画分(50.2 ± 8.4%)と短縮画分(22.4 ± 4.6%)を比較すると、連続した5日間注射された、3つの用量レベルのrhNRG-1は、拍出画分(71.1 ± 12.0%、64.4 ± 12.9%、62.9 ± 8.4%)および短縮画分(36.9 ± 9.7%、32.0 ± 9.5%、30.3 ± 6.1%)を上昇し得、20μg/kgと10μg/kgとモデル動物群との間に有意差が存在し( $P < 0.01$ )、さらに、試験薬物群のモデル動物における拍出画分の変化は、薬物投与後約35日間、維持され得る( $P < 0.05$ )；20μg/kgのrhNRG-1は、心筋の虚血性低酸素領域を有意に減少し得、線維性病変における毛細管数を増加し得る( $P < 0.05$ )；20μg/kgおよび10μg/kgのrhNRG-1は、モデル動物の末梢血液におけるアンギオテンシンI(AI)、アンギオテンシンII(AII)、レニン(PRA)およびアルドステロン(ALD)のレベルを減少し得、モデル動物群のものと比較した場合、有意差を有する( $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ )。連続した10日の薬物投与と、連続した5日の薬物投与との間には有意差は存在しなかった( $P < 0.05$ )。

【0171】

実験の結果は、連続した5日間、静脈内に注射された特定の用量の20μg/kgのrhNRG-1は、冠動脈の結紮によって生じたラットの心不全を効果的に処置し得ることを示した。

【0172】

(実施例3 SDラットにおいてアドリアマイシンにより引き起こされた心不全に対する、20μg/kgのrhNRG-1の治療効果)

(1. 要約)

(目的) ラットにおいてアドリアマイシンに引き起こされた毒性心筋炎に対する、20μg/kgのrhNRG-1の治療効果を研究すること。(方法) 3.3mg/kgのアドリアマイシンを、1週間毎の連続4回の注射で、SDラットの尾静脈に注射し、アドリアマイシンが引き起こすSDラットの毒性心筋炎モデルを準備した。3つの用量レベルのrhNRG-1群を準備し、これらに、10μg/kg、20μg/kgおよび40μg/kgを、連続した10日間、1日あたり1回(qd)、静脈内に注射した。動物の生存をモニタリングした：血流動的指数、心臓重量/体重の比、心筋の病理学的検査を実験の終わりにモニタリングし、血清中のトロポニンT(cTnT)レベルもまた決定した。(結果) 40μg/kg、20μg/kgおよび10μg/kgの用量レベルのrhNRG-1群の生存率は、モデル動物の15%の生存率と比較して、有意に上昇し、それぞれ、85%、90%および60%に達した。試験薬物の高用量レベル、中用量レベルおよび低用量レベルの群のdp/dt、-dp/dtおよびLV Pmaxは、有意に上昇し、dp/dtはそれぞれ、5954 ± 689、6107 ± 418および4875

10

20

30

40

50

± 6 3 6 に達し、 $-dp/dt$  はそれぞれ、 $-4794 \pm 954$ 、 $-4323 \pm 457$  および  $-3672 \pm 884$  であり、 $LVP_{max}$  はそれぞれ、 $165.72 \pm 22.7$ 、 $156.1 \pm 17.7$  および  $145 \pm 15.2$  であり、モデル動物群と比較した場合、有意差 ( $P < 0.001$ ) が存在し、さらに、 $40 \mu g/kg$  および  $20 \mu g/kg$  の用量群と、 $10 \mu g/kg$  の用量群との間の  $dp/dt$ 、 $-dp/dt$ 、 $LVP_{max}$  には有意差が存在し ( $P < 0.05$ )、いくらか用量依存性であった； $40 \mu g/kg$ 、 $20 \mu g/kg$  および  $10 \mu g/kg$  の  $rhNRG-1$  は、モデル動物における心筋損傷の重篤度を効率的に改善し得、かつ、血漿中のトロポニン T ( $cTnT$ ) レベルを減少し得、これらは、それぞれ、 $0.025 \pm 0.011$ 、 $0.031 \pm 0.006$  および  $0.074 \pm 0.024$  であり、モデル群の  $0.205 \pm 0.072$  と比較した場合、有意差があった ( $P < 0.01$ )。 (結論)  $20 \mu g/kg$  の  $rhNRG-1$  は、ラットにおいてアドリアマイシンにより引き起こされた毒性心筋損傷を効率的に処置し得る。

#### 【0173】

##### (2. 実験の目的)

ラットにおいてアドリアマイシンにより引き起こされた毒性心筋炎に対する  $rhNRG-1$  の治療効果を研究するため。

#### 【0174】

##### (3. 試験薬物)

$rhNRG-1$ 、Zensun (Shanghai) Science & Technology Development Co. Ltd 製。バッチ番号：200110006-2 規格： $500 \mu g$  / アンプル。力価測定： $5000 u$  / アンプル；純度： $> 95\%$  (HPLC-C8)。

#### 【0175】

##### (4. 実験動物)

SDラット：Experimental Animal Center of Fudan University Medical Collegeより提供された、動物適格性の証明書番号：Yi Dong Zi 02-22-11。体重  $250 \pm 30 g$ 、雄性。動物を、ランダムに群 (各群 20 匹の動物) に分け、別々のケージで飼育した。動物室の温度は  $18 \sim 22$  であり、相対湿度は  $50\% \sim 70\%$  であった。

#### 【0176】

##### (5. 試薬および設備機器)

6リード電気-生理学的レコーダー (Six leads electro-physiology recorder)、SMUP-C-6 (Physiology Department of Shanghai Medical University 製)；

エネルギー交換器 (Japan Photoelectricity Industry Company、NIHON KOHDEN、モデル：TP-400T)；

電気化学発光自動免疫分析装置 (モデル 2010)：Roche Diagnostics Co Ltd、バッチ番号 158468；

精密電気天秤 (Precisive electro-balance)、(Mater 40  
ler-Tolido Equipment Co Ltd；Max： $610 g$   $d=0.01 g$ )；

マイクロスケールノギス (Harbin Measure & Knife Factory、 $0.05 mm$ )；

動静脈留置針、 $20 Gm$  (Sino-America Weng Zhou Hua Li Medical Equipment Company 製)；

血清トロポニン測定のための試薬キット (Behring Diagnostic Inc.)。

#### 【0177】

##### (6. 実験方法)

10

20

30

40

50

## (6.1 実験のグループ分け)

正常なコントロール群、モデル動物群および試験薬物群を準備した；モデル群（ネガティブコントロール群）：アドリアマイシン（Ming Zhi Pharmaceutical 製；Shan Tou Special Economy Prefecture（バッチ番号：000201、有効期限：2003年2月）；試験薬物群：rhNRG-1 群。

## 【0178】

(6.2 用量の設定、試験薬物の調製、薬物の投薬経路、薬物の投与回数、試験薬物の濃度および容量)

試験薬物群の10 $\mu$ g/kg、20 $\mu$ g/kgおよび40 $\mu$ g/kgの3つの用量レベルを設定した。1mlの注射用水で溶解し、賦形剤で必要な濃度に調節した。賦形剤の主要な成分は、5%マンニトール（注射用）、0.2%ヒト血清アルブミン（注射用）、10mMリン酸緩衝溶液（Zensun (Shanghai) Science & Technology Development Co Ltd. 製）であった。試験薬物を注射前に調製した。

## 【0179】

アドリアマイシンの初回注射後、24時間以内に、rhNRG-1 を尾静脈に注射し、rhNRG-1 の注射を、10日間にわたって、1日1回実施した。用量は、体重によって調節し、投与される薬物の容量は、0.2ml/100gであった。

## 【0180】

## (6.3 実験方法)

## (6.3.1 動物心不全モデルの構築方法)

<<Guidance Principle of New Drug Preclinical Experiment>>に基づいて、3.3mg/kgのアドリアマイシンを、連続4回にわたって、1週間に1回の注射で、尾静脈に注射し、アドリアマイシンが引き起こした毒性心筋炎ラットモデルを確立した。

## 【0181】

## (6.3.2 薬力学的実験)

アドリアマイシンの初回注射の後、24時間以内に、rhNRG-1 を尾静脈に注射した。実験の間、動物の生存を、動力学的にモニタリングし、心臓機能指数（左心室内の圧増加の最大速度である $dt/dp_{max}$ 、左心室内の圧減少の最大速度である $-dp/dt$ 、左心室の収縮期圧である $LV P_{max}$ 、左心室の拡張期圧である $LV P_{min}$ ）を、5週目にモニタリングした。心臓組織から切片を作製し、病理学的変化を試験した。

## 【0182】

## (6.3.3 観察指数)

## (6.3.3.1 生存率)

生存の状況を毎週記録し、種々の実験群の生存率を算出した。生存率(%) = 生存動物数 / 実験動物数  $\times 100$

## (6.3.3.2 心臓の重さ/体重の比、心臓組織の病理学的切片)

開胸術（心耳は取っておかれる）の後、心臓を摘出し、吸収紙で乾燥させた後、心臓の重さを測定し、心臓の重さ/体重の比を算出した；心臓の外径を、垂直に立っている心臓の1/2の部位で測定した；左心室の中間部分を横方向に切開し、左心室の遊離壁（free wall）の最大厚を測定した；心臓を10%ホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋し、HE染色し、光学顕微鏡下で心筋構造の観察を行って、病理学的スコアを割り当てた。

## 【0183】

(病理学的スコア付けの基準：)

グレード0：正常な心筋構造、心筋細胞の萎縮または肥大を伴わず、液胞および横紋ははっきりとしている；心筋の規則正しい配列；異常のない心内膜および心膜；血管および間質組織に変化はない。

## 【0184】

グレード1：心筋細胞質の病巣溶解と、液胞の形成が、散在した個々の心筋細胞において見られ、一方で、隣接する心筋細胞は依然として正常に見えた。

## 【0185】

グレード2：心筋細胞質の萎縮、溶解および液胞の形成が、小～中程度のクラスター形成した心筋細胞において見られ、心筋細胞の小さな病巣壊死がまた見られた。

## 【0186】

グレード3：心筋細胞の広い範囲の散在性の萎縮と、細胞質の溶解、または、極めて顕著な壊死を伴う液胞の形成。スコア付けは、グレード1とグレード2の間、またはグレード2とグレード3の間（例えば、グレード1.5、グレード2.5など）で行われ得る。

10

## 【0187】

(6.3.3.3 血行動態指数の決定)

血行動態指数（例えば、頸動脈圧、心室内圧、 $dp/dt$ ）を、6リード電気-生理学的レコーダーで測定した。主な手順：右頸動脈を分離し、その遠位端で結紮し、動脈クランプでその近位端をブロックし、20G動静脈留置針を頸動脈に挿入して、メダル探針を摘出し、動脈クランプを緩めてプラスチック套管針をさらに適切な深さまで押し込み、10分間留置して、生理学的レコーダーにより記録された波形を観察し、波形が安定した後に、頸動脈圧を記録し、そして、左心室へとさらに套管針を押し込み、適所に15分間維持して、波形が安定した後に、 $dp/dt$ 、 $-dp/dt$ 、 $LVP_{max}$  および  $LVP_{min}$  を記録した。

20

## 【0188】

(6.3.3.4 血清トロポニンT (cTnT) レベルの決定)

2mlの動脈血を回収し、血清を抽出して、凍結し、 $-20^{\circ}\text{C}$ にて保存し、Clinical Laboratory of Zhong Shan Hospitalによって実施されているように提示された、電気化学照射法を用いて、血清cTnT含量の決定を行った。

## 【0189】

(7. データ処理)

データを  $X \pm SD$  として表した。群間の差を、一階乗分散分析 (monofactorial variance analysis) を用いて分析した。

30

## 【0190】

(8. 実験の結果)

(8.1 アドリアマイシンは、ラットにおいて心不全を合併した毒性心筋炎を誘導し得る)

表10および図18を参照のこと。3.3mg/kgのアドリアマイシンを、4連続の毎週一回の注射で、静脈内注射した。5週後、動物の生存率は15%であり、生存しているラットにおいて有意な心臓機能の障害が見られた。これらの  $dp/dt$ 、 $-dp/dt$ 、 $LVP_{max}$ 、 $LVP_{min}$  は、それぞれ、正常値の43%、47%、58%および37%であった。心筋組織の病理学的スコア付けは、 $2.33 \pm 0.26$  であり、相対罹患率は100%であった。血清cTnTは、有意に増加して0.2ng/mlに達し、このことは、アドリアマイシンにより引き起こされた毒性心筋炎と結果として生じる心不全の動物モデルが、首尾よく確立されたことを示す。

40

## 【0191】

(表10 アドリアマイシンにより誘導された毒性心筋炎ラットモデルの種々の決定指数 (determination index))

## 【0192】

【表 10】

	コントロール群	モデル動物群
生存率 (%)	100	15
心筋組織の病理学的なスコア	0	2.33 ± 0.26 *
dp/dt (mmHg/s)	6235 ± 423	2674 ± 446 **
- dp/dt	- 4590 ± 1003	- 2141 ± 596 **
LVP <sub>max</sub> (mmHg)	181.4 ± 15.4	106.1 ± 21.2 *
LVP <sub>min</sub>	-27.1 ± 10.2	-10.0 ± 4.7 **
cTnT (ng/ml)	0.001 ± 0.000	0.205 ± 0.072 **
心臓の重さ / 体重	0.0032 ± 0.0002	0.0031 ± 0.0001
左心室壁の厚さ (mm)	1.88 ± 0.15	1.73 ± 0.16
心臓の外周 (mm)	31.0 ± 1.1	30.6 ± 0.1

10

n = 20、 $\bar{X} \pm SD$ 、正常群と比較した場合の分散分析、\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.001$ 。

## 【0193】

20

図18は、アドリマイシンにより誘導されたSDラットの毒性心筋炎の心筋の病理学的切片を示す；a：正常なコントロール群：心筋の病理学的スコアは0であり、心筋細胞の萎縮および肥大は伴わず、液胞の形成が見られ、横紋がはっきりと見られ得る；心筋は規則正しく整列していた；心内膜および心膜の異常なし；脈管および間質組織の変化なし；b：モデル動物群：心筋の病理学的スコアは3であった、広い領域の心筋細胞の壊死および溶解。

## 【0194】

(8.2モデル動物の生存率におけるrhNRG-1の効果)

この結果は、延長された実験時間でrhNRG-1の3つ全ての投薬レベルが、モデル動物の死亡率を有意に減少させ、20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ の投薬群のモデル動物の生存率が90%に達したことを示した ( $P < 0.01$ ) (図19)。

30

## 【0195】

(8.3モデル動物の心臓機能におけるrhNRG-1の効果)

薬物投与の後、全ての試験薬物群動物のdp/dtおよびLVP<sub>max</sub>は、いくらか上昇した。SPSSソフトウェアでの一因数変数分析(monofactorial variance analysis)を通して、内部群比較が、試験薬物群動物のdp/dtおよび-dp/dtがモデル動物群のdp/dtおよび-dp/dtと比べて有意に高く ( $P < 0.001$ )、コントロール群のdp/dtおよび-dp/dtと比較した場合、その差は有意ではない ( $P > 0.05$ ) ことを示した。40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ および20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ の投薬群のdp/dtおよび-dp/dtは、10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ の投薬群のdp/dtおよび-dp/dtより有意に高く ( $P < 0.01$ )；試験薬物群のLVP<sub>max</sub> (40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ および10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )は、同様にモデル動物群のdp/dtおよび-dp/dtより有意に高く ( $P < 0.001$ )、さらに、種々の試験薬物群の間の差は、統計的に有意であり ( $P < 0.05$ )、rhNRG-1は、モデル動物の心臓機能を改善するのに効果的であり得、用量依存性であることを示した。2つの実験の結果は、一致した (表11および表12)。

40

## 【0196】

(表11.モデル動物(I)の心臓機能におけるrhNRG-1の効果)

## 【0197】

【表 1 1】

群	薬物投与	+dp/dt(mmHg/s)	-dp/dt(mmHg/s)	LVP <sub>max</sub> (mmHg)	LVP <sub>min</sub> (mmHg)
標準コントロール群 (n=8)		6235±423**	-4590±1003**	181.4±15.4**	-27.1±10.2**
モデル群 (n=6)	iv qd×10d	2674±446	-2141±596	106.1±21.2	-10±4.7
rhNRG-1β 40μg/kg (n=8)	iv qd×10d	5954±689**	-4794±954**	165.7±22.7**	-27.4±10**
rhNRG-1β 20μg/kg (n=8)	iv qd×10d	6107±418**	-4323±457**	156.1±17.7**	-26.9±9.7**
rhNRG-1β 10μg/kg (n=8)	iv qd×10d	4875±636**	-3672±884**	145±15.2**	-24.5±9.6**

\* p < 0.05 ; \*\* p < 0.001 (モデル動物群と比較した場合)  
(表 1 2 . モデル動物 ( I I ) の心臓機能における r h N R G - 1 の効果)

【0 1 9 8】

【表 1 2】

試料	薬物投与	+dp/dt(mmHg/s)	-dp/dt(mmHg/s)	LVP <sub>max</sub> (mmHg)	LVP <sub>min</sub> (mmHg)
標準群 (n=8)		5872±342**	-4626±896**	159±25**	-22.7±12*
モデル動物群 (n=8)	iv qd×10d	2675±359	-2137±334	103.9±11.5	-11.3±5.4
rhNRG-1β 40μg/kg (n=7)	iv qd×10d	6041±461**	-4529±274**	166.3±12.4**	-22.2±11.4*
rhNRG-1β 20μg/kg (n=7)	iv qd×10d	5833±416**	-4345±807**	157.7±12**	-26.6±7.4*
rhNRG-1β 10μg/kg (n=8)	iv qd×10d	4956±352**	-3626±1056**	158.2±22.9**	-22.4±18

\* p < 0.05 ; \*\* p < 0.001 (モデル動物群と比較した場合)  
( 8 . 4 モデル動物の心筋構造における r h N R G - 1 の効果 )

r h N R G - 1 は、モデル動物の心筋細胞損傷の重篤度を有意に減少し、病理学上のスコアを有意に減少し、その差は、モデル群のものと比較した場合に統計的に有意であった ( p < 0.01、P < 0.05 )。表 1 3 および表 1 4 ならびに図 2 0 は、2つの実験の結果を示した。

【0 1 9 9】

( 図 2 0 . モデル動物の心筋構造の r h N R G - 1 の効果 )

a : モデル動物心筋病理学的スコアは 3 であった、心筋細胞壊死および崩壊の大きな領域 ; b : 40 μ g / k g 試験薬物群、心筋病理学的スコアは 1 であり、心筋細胞のほとんどは正常であり、散在性心筋細胞中の局所的な心筋細胞質崩壊が存在した ; c : 20 μ g / k g 試験薬物群、心筋病理学的スコアは 1 であり、心筋細胞のほとんどは正常であり、散在性心筋細胞中の局所的な心筋細胞質崩壊が存在した ; d : 130 μ g / k g の試験薬物群、心筋病理学的スコアは 1.5 であり、小胞変性が、心筋細胞の小さなクラスター中で見られた。

10

20

30

40

50

## 【 0 2 0 0 】

( 表 1 3 . モデル動物 ( I ) の心筋病理学的変化における r h N R G - 1 の効果 )

## 【 0 2 0 1 】

## 【 表 1 3 】

群	薬物投与	病理学的スコア付け
標準群 (n=6)		0.00±0.00**
モデル群 (n=6)	iv qd×10d	2.33±0.26
rhNRG-1 β 40μg/kg (n=6)	iv qd×10d	0.33±0.41**
rhNRG-1 β 20μg/kg (n=6)	iv qd×10d	1.17±0.93*
rhNRG-1 β 10μg/kg (n=6)	iv qd×10d	1.83±0.41*

10

\* p &lt; 0 . 0 5 ; \* \* p &lt; 0 . 0 1 (モデル動物群のスコアと比較した場合)

( 表 1 4 . モデル動物 ( I I ) の心筋病理学的変化における r h N R G - 1 の効果 )

## 【 0 2 0 2 】

## 【 表 1 4 】

群	薬物投薬	病理学的スコア付け
標準群 (n=6)		0±0**
モデル動物群 (n=6)	iv qd×10d	2.75±0.274
rhNRG-1 β 40μg/kg (n=6)	iv qd×10	0.583±0.204**
rhNRG-1 β 20μg/kg (n=6)	iv qd×10d	1.667±0.931*
rhNRG-1 β 10μg/kg (n=6)	iv qd×10d	2.167±0.516*

20

\* p &lt; 0 . 0 5 ; \* \* p &lt; 0 . 0 1 (モデル動物群のスコアと比較した場合)

( 8 . 5 モデル動物の血清 c T n T における r h N R G - 1 の効果 )

薬物投与の後、血清 c T n T 含有量は、各々の動物群において有意に減少し、血清 c T n T の高い、中間の、および低い投薬レベル群は、モデル群より有意に低かった ( P < 0 . 0 0 1 ) 。 これら 2 つの実験の結果は、一致した ( 表 1 5 および表 1 6 ) 。

30

## 【 0 2 0 3 】

( 表 1 5 . モデル動物 ( I ) の血清 c T n T における r h N R G - 1 の効果 )

## 【 0 2 0 4 】

## 【 表 1 5 】

群	薬物投与	cTnT (ng/ml)
標準群 (n=5)		0.001±0.000**
モデル群 (n=6)	iv qd×10d	0.205±0.072
rhNRG-1 β 40μg/kg (n=6)	iv qd×10d	0.025±0.011**
rhNRG-1 β 20μg/kg (n=6)	iv qd×10d	0.031±0.006**
rhNRG-1 β 10μg/kg (n=6)	iv qd×10d	0.074±0.024**

40

\* \* p &lt; 0 . 0 0 1 (モデル動物群の c T n T と比較した場合)

( 表 1 6 . モデル動物 ( I I ) の血清 c T n T における r h N R G - 1 の効果 )

## 【 0 2 0 5 】

【表 1 6】

群	薬物投与	cTnI (ng/ml)
標準群 (n=6)		0.433±0.079**
モデル群 (n=6)	iv qd×10d	20.525±20.638
rhNRG-1 β 40μg/kg (n=6)	iv qd×10	0.874±0.108**
rhNRG-1 β 20μg/kg (n=6)	iv qd×10d	1.677±0.589**
rhNRG-1 β 10μg/kg(n=6)	iv qd×10d	8.342±13.537**

\* \* p < 0 . 0 0 1 (モデル動物群のものと比較した場合)

( 8 . 6 モデル動物の心臓サイズにおける r h N R G - 1 の効果 )

表 1 8 は 2 つの実験の結果を示した。試験薬物群の心臓身体的パラメーターにおける有意な変化はなく、群の間の差は、統計的に有意でなかった ( P > 0 . 0 5 ) 。

【 0 2 0 6 】

( 表 1 7 . モデル動物 ( I ) の心臓のサイズにおける r h N R G - 1 の効果 )

【 0 2 0 7 】

【表 1 7】

群	薬物投与	心臓の重さ/体重	左心室壁の厚さ (mm)
標準群 (n=20)		0.0032±0.0002	2.01±0.07**
モデル動物群 (n=6)	iv qd×10d	0.0031±0.0001	1.717±0.154
rhNRG-1 β 40μg/kg (n=16)	iv qd×10d	0.0031±0.0002	1.813±0.12
rhNRG-1 β 20μg/kg (n=18)	iv qd×10d	0.0032±0.0001	1.789±0.133
rhNRG-1 β 10μg/kg (n=13)	iv qd×10d	0.00301±0.0002	1.773±0.115

\* \* p < 0 . 0 1 (モデル動物群と比較した場合)

( 表 1 8 . モデル動物 ( I I ) の心臓のサイズにおける r h N R G - 1 の効果 )

【 0 2 0 8 】

【表 1 8】

群	薬物投与	心臓の重さ / 体重	左心室壁の厚さ (mm)
標準群 (n=20)		0.00310±0.000	2.19±0.2**
モデル群 (n=10)	iv qd×10d	0.00298 ± 0.000	2.065±0.17
rhNRG-1 β 40μg/kg (n=18)	iv qd×10	0.00297±0.000	2.06±0.2
rhNRG-1 β 20μg/kg (n=19)	iv qd×10d	0.00303±0.000	2.15±0.24
rhNRG-1 β 10μg/kg g(n=16)	iv qd×10d	0.00307±0.000	2.18±0.21

\* \* p < 0 . 0 1 (モデル動物群と比較した場合)

( 9 . 結論 )

4 0 μ g / k g 、 2 0 μ g / k g および 1 0 μ g / k g の r h N R G - 1 は、生存率を有意に改善し、モデル群の 1 5 % の生存率と比較して各々 8 5 % 、 9 0 % および 6 0 % に

10

20

30

40

50

達した； $dp/dt$ 、 $-dp/dt$ および $LVP_{max}$ の高い、中間の、および低い投薬レベル群は、有意に増加し、 $dp/dt$ は、各々 $5954 \pm 689$ 、 $6107 \pm 418$ 、 $4875 \pm 636$ であった。 $-dp/dt$ は、各々 $-4794 \pm 954$ 、 $-4323 \pm 457$ 、 $-3672 \pm 884$ であった。そして $LVP_{max}$ は、それぞれ $165.7 \pm 22.7$ 、 $156.1 \pm 17.7$ 、 $145 \pm 15.2$ であった。コントロール群と比較する際に有意な差が存在した ( $P < 0.001$ )。さらに、 $40 \mu g/kg$ および $20 \mu g/kg$ の投薬群の $dp/dt$ 、 $-dp/dt$ および $LVP_{max}$ は、 $10 \mu g/kg$ 群の $dp/dt$ 、 $-dp/dt$ および $LVP_{max}$ と有意に異なり ( $< 0.05$ )、そしてある程度用量依存性であり； $40 \mu g/kg$ 、 $20 \mu g/kg$ および $10 \mu g/kg$ の $rhNRG-1$ の3つ全ての用量レベルは、モデル動物における心筋損傷の重篤度を効果的に軽減し、血清トロポニンT ( $cTnT$ )含有量を減少し、各々 $0.025 \pm 0.011$ 、 $0.031 \pm 0.006$ および $0.074 \pm 0.024$ であり、モデル動物群の $0.205 \pm 0.072$ と比較した場合、有意な差が存在した ( $P < 0.01$ )。

#### 【0209】

実験の結果は、 $rhNRG-1$ が、 $cTnT$ の減少した血清放出および心筋線維壊死を介してラットにおける $Adriamycin$ による毒性心筋障害を効果的に処置し得、心臓の収縮機能を改善し、動物の死亡率を減少させたことを示した。

#### 【0210】

(実施例4 マウスにおけるウイルス感染によって引き起こされる急性心筋損傷における $rhNRG-1$ の治療効果)

##### (1. 要旨)

目的：ウイルス( $Coxsackie B3$ )感染により引き起こされる急性心筋損傷における $rhNRG-1$ の治療効果を研究すること。方法：Mマウス( $Mmouse$ )急性ウイルス心筋モデルが、 $Coxsackie B3$ ウイルス( $CVB_3$ )の腹内感染を介して確立した。モデル動物を、以下の群に無作為に分割した：すなわち、正常なコントロール群、モデル群、試験薬物群(各々の群は20匹の動物を有する)。 $rhNRG-1$ の $30 \mu g/kg$ 、 $15 \mu g/kg$ 、および $7.5 \mu g/kg$ の3つの投薬レベルが確立され、尾静脈中に注入され、これは、連続した5日間の間と同じ日に実行された。実験の間、動物生存率をモニタリングした。心臓機能試験(心エコー検査)を7日目に実施し、8日目にその動物を殺し、血清をトロポニンI ( $cTnI$ )レベル決定のために抽出し、そして心臓病理学的試験を実施した。結果： $30 \mu g/kg$ および $15 \mu g/kg$ の両方の群のEF値( $90.2 \pm 2.5\%$ 、 $86.0 \pm 2.9\%$ )およびFS値( $55.7 \pm 2.1\%$ 、 $50.7 \pm 4.3\%$ )は、有意に増大した；モデル群の値と比較して有意な差が存在し( $P < 0.01$ )、 $LVDd$ 値( $0.187 \pm 0.006$ 、 $0.189 \pm 0.008$ )および $LVDs$ 値( $0.085 \pm 0.009$ 、 $0.099 \pm 0.027$ )は、モデル群の値( $0.208 \pm 0.015$ 、 $0.142 \pm 0.020$ )より有意に低かった( $P < 0.05$ )； $rhNRG-1$ は、心筋病理学的損傷の重篤度を軽減し、血清トロポニン( $cTnI$ )レベルを効果的に減少し、 $cTnI$ の $30 \mu g/kg$ の用量群( $7.98 \pm 6.07 ng/ml$ )および $15 \mu g/kg$ の用量群( $19.43 \pm 10.76 ng/ml$ )は、モデル群( $44.44 \pm 12.39 ng/ml$ )の $cTnI$ より有意に低く、これらの間の差は、統計的に有意であった( $P < 0.001$ 、 $P < 0.005$ )； $30 \mu g/kg$ の $rhNRG-1$ は、モデル動物の生存比を有意に改善し、この比は80%に達した( $P < 0.05$ )。結論： $rhNRG-1$ の特定の用量が、ウイルス感染によって生じる急性心筋障害を効果的に処置し得た。

#### 【0211】

##### (2. 実験の目的)

マウス中のウイルス感染により生じる急性心筋損傷における $rhNRG-1$ の治療効果を研究することおよび任意の有効な用量を見出すこと。

#### 【0212】

##### (3. 試験薬物)

10

20

30

40

50

rhNRG-1 (Zensun (Shanghai) Science & Technology Developmentによって提供される)。ロット番号：200110006-2。滴定：5000u；純度：>95% (HPLC-C8)。

【0213】

(4. 実験動物)

4.1種、供給源、能力の証明：4週齢の純粋繁殖されたBALB/Cマウス (Fudan Universityの実験動物部門により提供された) 動物能力の証明書番号：Yi Dong Zi 22-9。

【0214】

4.2体重および性：10-12g、雄

10

4.3各々の群の動物数：各々の実験群における20匹の動物、正常なコントロール群の10匹の動物

(5. ウイルス)

Coxsackie Virus B3、CVB<sub>3</sub>、Nancy株 (Ministerial Viral Heart Disease Laboratory (Shanghai Municipal Cardiovascular Diseases Institute) により提供された)。

【0215】

(6. 試薬および装置)

6.1心エコー検査装置、Hewlett Packard sonos 5500；  
プローブの型：S12'；

20

6.2Immuno-Assay System Opus (登録商標) Plus (血清トロポニンI (cTnI) を決定するためのBehring Diagnostic Inc. により生成された)、ロット番号：CTE8；

6.3正確な電子天秤、KERN822；

6.4注入のための水、Zang Jiang Andus Bioproduct Co Ltd, 10x5ml、ロット番号：0112180；

6.5脱毛剤、8%硫化ナトリウム、GuangDong XiLong Chemical Plant、ロット番号：010622。

【0216】

30

(7. 実験の方法)

7.1実験群

正常なコントロール群、モデル群、試験薬物群および偽薬コントロール群を、準備した；モデル群は、ネガティブコントロール群である (n=20)。調製された緩衝液が、投与された (10mN PB, 0.2%ヒト血清アルブミン、5%マンニトール)；

試験薬物群 (n=20)：高い、中間の、低い投薬レベルのrhNRG-1群が分割された；偽薬コントロール群 (n=20)：非CVB3凍結解凍細胞上清の腹内注射、0.2ml/動物。

【0217】

(7.2投薬設定、試験薬物の調製、薬物投与の経路、薬物投与の回数、試験薬物の濃度および容積)

40

3つの投薬レベル、30μg/kg、15μg/kgおよび7.5μg/kgの試験薬物群が、予備実験の結果に基づいて確立された。調製緩衝液 (10mM PB, 0.2%ヒト血清アルブミン、5%マンニトール) で必要とされる濃度に希釈した。

【0218】

試験薬物群とモデル群との両方の薬物投与は、マウスの尾静脈への静脈内注入であった。毎日1回 (qd)、連続する5日間について、投与される各々の薬物の容積は、0.2ml/動物であった。

【0219】

(7.3実験の方法)

50

### 7.3.1 マウス中の急性ウイルス心筋炎動物モデルの準備

Fudan Universityに付属するZhong Shan Hospitalにより提供される0.2mlの $100 \times TCID_{50} CVB_3$ を、腹内に注入し、心筋モデルを確立した。続く一週間以内に、マウスは、起毛、脱毛、衰弱、不活発化および死を示し、試験動物の約半数が、8日目に死んだ。

#### 【0220】

##### (7.3.2 薬力学的実験)

試験薬物の尾静脈への静脈内注入が、マウスにおける腹内ウイルス感染と同じ日に実施された。この注入は、連続する5日間の間実施され、動物生存率がモニタリングされ、実験の完了の後、心エコー検査、心筋病理学的試験、血清トロポニン測定が、実施された。

10

#### 【0221】

##### (7.3.3 観察指標)

##### 7.3.3.1 マウスにおける心臓機能測定

胸部脱毛を、ウイルス感染の7日目に実施し、次いでマウスを、特別に作製された固定化マウント上に固定し、心エコー検査を、S12高振動数プローブを用いて実施した。主な指標は、以下を含んだ：

EF：左心室の駆出画分であって、左心室の駆出機能を反映する主な指標；

FS：左心室の短縮画分であって、左心室の収縮機能を反映する指標；

LVDd：心臓拡張最大内部直径（cm）；

LVDs：心収縮最小内部直径（cm）。

20

#### 【0222】

##### (7.3.3.2 マウス中の血清トロポニンI（cTnI）の測定）

心筋損傷の重篤度は、他の慣習的な指標（例えば、CK、LDH、およびAST）と比較する場合、高い特異性および高い感度の利点を有する、血清cTnIの量の測定を介して評価された。従って、血清cTnI含有量測定を、心筋損傷の重篤度を反映する客観的な指標として使用した。ウイルス感染の8日目にて、マウスの体重が測定され、血液が眼窩から引き出され、血清が分離され、-20の冷凍庫で保存され、発光反応を有する血清cTnI測定が、実行された。

#### 【0223】

##### (7.3.3.3 マウス中の心筋の病理学的試験)

試験は、Fudan Universityに付属するShanghai Medical Collegeの病理学部により実行されるように付託された。

30

#### 【0224】

生き残ったマウスを、頸部棘を脱臼させることにより殺し、無菌開胸術を実施し、心臓を摘出し、心臓重量を測定し、固定のためにホルムアルデヒド中に心筋層を入れ、パラフィン中で包埋し、連続した切片を作製し、病理学的試験を実施し、心筋の炎症細胞浸潤、変性および壊死を観察した。新薬評価ガイドラインの原理に基づいて、病理学的スコア基準を、以下のように規定した：

スコア0：0%を占める病変領域；

スコア1：25%を占める病変領域；

スコア2：50%を占める病変領域；

スコア3：75%を占める病変領域；

スコア4：100%を占める病変領域；

40

スコアリングを、スコア1とスコア2との間で、またはスコア2とスコア3との間で実施し得た（例えば、病変領域が80%である場合は、スコア3.2としてスコアされた）。

#### 【0225】

##### (7.3.3.4 マウスの生存における観察)

種々の試験薬物群におけるモデル動物の死の状態が、モニタリングされた。

#### 【0226】

50

## ( 8 . データ処理 )

関連するデータの1対のt検定 ( pairing t test ) が、データ処理について使用された。

## 【 0 2 2 7 】

## ( 9 . 結果 )

9 . 1 ウイルスで感染されたマウスの心臓機能における rhNRG - 1 の効果

結果は、EF値 ( 67 . 1 ± 9 . 9 % ) およびFS値 ( 32 . 0 ± 7 . 2 % ) の両方が、正常な値 ( EF , 92 . 5 ± 2 . 3 % / FS 59 . 2 ± 3 . 1 % ) より有意に低かった、 $p < 0 . 05$  ; rhNRG - 1 群の  $30 \mu\text{g} / \text{kg}$  および  $15 \mu\text{g} / \text{kg}$  のEF値 ( 90 . 2 ± 2 . 5 % , 86 . 0 ± 2 . 9 % ) およびFS値 ( 55 . 7 ± 2 . 1 % , 50 . 7 ± 4 . 3 % ) は有意に増加し、モデル群の値と比較する場合、有意な差が存在した (  $P < 0 . 01$  ) 。  $7 . 5 \mu\text{g} / \text{kg}$  群のEF / FSは、モデル群のEF / FSと有意な差を有さなかった (  $P > 0 . 05$  ) 。

10

## 【 0 2 2 8 】

モデル群のLVDd値 ( 0 . 208 ± 0 . 015 cm ) およびLVDs値 ( 0 . 142 ± 0 . 020 cm ) は、正常なコントロール群の値よりも有意に高く ( LVDs , 0 . 179 ± 0 . 007 cm / LVDs , 0 . 073 ± 0 . 006 cm ) 、これらの間に有意な差が存在した (  $P < 0 . 01$  ) 。 rhNRG - 1 群の  $30 \mu\text{g} / \text{kg}$  および  $15 \mu\text{g} / \text{kg}$  のLVDdおよびLVDsは、モデル群のLVDdおよびLVDsより有意に低い (  $P < 0 . 05$  ) 一方、  $7 . 5 \mu\text{g} / \text{kg}$  のLVDdおよびLVDsは、モデル群のLVDdおよびLVDsと有意に異ならなかった (  $P > 0 . 05$  ) 。表19および表20は、2度繰り返された実験の結果を示した。

20

## 【 0 2 2 9 】

( 表 19 . ウイルス ( I ) に感染したマウスにおける5日間の薬物投与後の心機能の決定パラメーター )

## 【 0 2 3 0 】

## 【 表 1 9 】

群	薬物投与 レジメン	LVDd (cm)	LVDs (cm)	EF (%)	FS (%)
標準コントロール群		0.179 ±0.007**	0.073 ±0.006**	92.5 ±2.3**	59.2 ±3.1**
モデル群	iv	0.208	0.142	67.1	32.0
	qd×5	±0.015	±0.020	±9.9	±7.2
hNRG-1β 30μg/kg	iv	0.187	0.085	90.2	55.7
	qd×5	±0.006**	±0.009**	±2.5**	±2.1**
rhNRG-1β 15μg/kg	iv	0.189	0.099	81.3	44.5
	qd×5	±0.008*	±0.027*	±6.28*	±8.27*
rhNRG-1β 7.5μg/kg	iv	0.191	0.114	78.1	41.7
	qd×5	±0.012	±0.028	±9.3	±9.6

30

40

上記データの各々において ( 各群  $n = 6$  ) 、SPSS一元配置分散分析によって、モデル群と比較 ( \*  $P < 0 . 05$  、 \*\*  $P < 0 . 01$  ) 。

## 【 0 2 3 1 】

( 表 20 . ウイルス ( II ) に感染したマウスにおける5日間の薬物投与後の心機能の決定パラメーター )

## 【 0 2 3 2 】

【表 2 0】

群	薬物投与 レジメン	LVDd (cm)	LVDs (cm)	EF (%)	FS (%)
標準コントロール群		0.189 ±0.008**	0.069 ±0.006**	94.5 ±0.56**	63.7 ±3.01**
モデル群	iv	0.232	0.159	63.1	30.3
	qd×5	±0.023	±0.031	±18.47	±10.75
rhNRG-1β	iv	0.196	0.094	87.7	51.8
30μg/kg	qd×5	±0.011**	±0.011**	±3.76**	±5.24**
rhNRG-1β	iv	0.201	0.114	81.6	44.9
15μg/kg	qd×5	±0.011*	±0.018*	±4.59*	±5.68*
hNRG-1β	iv	0.213	0.133	71.9	35.7
7.5μg/kg	qd×5	±0.009	±0.015	±6.69	±5.60

上記データの各々において（各群 n = 6）、SPSS一元配置分散分析によって、モデル群と比較（\* P < 0.05、\*\* P < 0.01）。

## 【0233】

（9.2. ウイルスに感染したマウスの血清 c T n I に対する r h N R G - 1 の効果）

結果により、モデル群の c T n I ( 44.44 ± 12.39 ng/ml ) が r h N R G - 1 30 μ g / k g のコントロール群 ( 3.28 ± 4.55 ng/ml ) より有意に高いことが示された。群 ( 7.98 ± 6.07 ng/ml ) は、モデル群より有意に低かった ( P < 0.01 ) ; r h N R G - 1 15 μ g / k g 群の c T n I ( 19.43 ± 10.76 ng/ml ) は、モデル群とは有意に異なった ( P < 0.05 ) のに対して、r h N R G - 1 7.5 μ g / k g 群 ( 29.05 ± 17.06 ng/ml ) の c T n I とモデル群の c T n I との間では、統計的有意差は何らなかった。表 2 1 および 2 2 は、2 つの実験の結果を示した。

## 【0234】

（表 2 1 . ウイルス ( I ) に感染したマウスにおける血清 c T n I ( n g / m l ) 含有量に対する r h N R G - 1 の効果）

## 【0235】

## 【表 2 1】

群	薬物投与レジメン	cTnI (ng/ml) 平均 ± 標準偏差
標準コントロール群		3.28 ± 4.55 **
モデル群	ivqd×5	44.44 ± 12.39
rhNRG-1β 30μg/kg	iv qd×5	7.98 ± 6.07 **
rhNRG-1β 15μg/kg	iv qd×5	19.43 ± 10.76 *
rhNRG-1β 7.5μg/kg	iv qd×5	29.05 ± 17.06
プラセボコントロール群		3.75 ± 2.36 **

上記データの各々において（各群 n = 6）、SPSS非母数検定（独立サンプル検定）分析によって、モデル群と比較（\* P < 0.05、\*\* P < 0.01）。

## 【0236】

10

20

30

40

50

(表22. ウイルス(II)に感染したマウスにおける血清cTnI (ng/ml)含有量に対するrhNRG-1の効果)

【0237】

【表22】

群	薬物投与レジメン	cTnI(ng/ml)
		平均 ± 標準偏差
標準群		0.19±0.06 **
モデル群	ivqd×5	34.05±16.50
rhNRG-1 β 30μg/kg	iv qd×5	0.54±0.53 **
rhNRG-1 β 15μg/kg	iv qd×5	15.59±14.94 *
rhNRG-1 β 7.5μg/kg	iv qd×5	26.85±15.20
プラセボコントロール群		14±0.03 **

10

上記データの各々において(各群 n = 6)、SPSS非母数検定(独立サンプル検定)分析によって、モデル群と比較(\* P < 0.05、\*\* P < 0.01)

(9.3. ウイルスに感染したマウスの心筋傷害に対するrhNRG-1の効果)

実験の結果により、通常群の心筋病理的スコアは、0.0 ± 0.00であり、モデル群の心筋病理的スコアは、2.22 ± 0.97であり、これらの間には有意差があることが示された(P < 0.01)。rhNRG-1の高用量および中間用量レベルの両方の病理的スコアは、有意に減少し(それぞれ、0.56 ± 0.47および0.73 ± 0.58)、モデル群とは有意差があり(P < 0.001)、低用量レベル群の病理的スコアとモデル群の病理的スコアとの間には有意差がなかった(P > 0.05)。表23および24ならびに図21および22は、2つの実験の結果を示す。

20

【0238】

(表23. ウイルス(I)に感染したマウスにおける心筋の病理的变化に対するrhNRG-1の効果)

【0239】

【表23】

群	薬物投与レジメン	病理学的スコア
		平均 ± 標準偏差
標準コントロール群 (n=10)		0.00±0.00 **
モデル群 (n=10)	ivqd×5	2.22±0.97
rhNRG-1 β 30μg/kg (n=17)	iv qd×5	0.56±0.47 **
rhNRG-1 β 15μg/kg (n=13)	iv qd×5	0.73±0.58**
rhNRG-1 β 7.5μg/kg (n=10)	iv qd×5	1.52±0.74
プラセボコントロール群(n=10)		0.00±0.00 **

40

上記データの各々において(各群 n = 6)、SPSS非母数検定(独立サンプル検定)分析によって、モデル群と比較(\* P < 0.05、\*\* P < 0.01)。

【0240】

(表24. ウイルス(II)に感染したマウスにおける心筋の病理的变化に対するrhNRG-1の効果)

【0241】

【表 2 4】

群	薬物投与レジメン	病理学的スコア
		平均 ± 標準偏差
標準コントロール群 (n=10)		0.00±0.00 **
モデル群 (n=10)	ivqd×5	2.03±1.44
rhNRG-1 β 30μg/kg (n=17)	iv qd×5	0.23±0.26 **
rhNRG-1 β 15μg/kg (n=13)	iv qd×5	0.57±0.58**
rhNRG-1 β 7.5μg/kg (n=10)	iv qd×5	1.34±1.16
プラセボコントロール群 (n=10)		0.00±0.00 **

10

上記データの各々において (各群 n = 6)、SPSS 非母数検定 (独立サンプル検定) 分析によって、モデル群と比較 (\* P < 0.05、\*\* P < 0.01)。

## 【0 2 4 2】

(9.4 ウイルスに感染したマウスの生存率に対する rhNRG-1 の効果)

表 2 5 および 2 6 は、2つの実験の結果を示した。ウイルスを注射して1週間後、モデル群のマウスの生存率は、それぞれ、50%および55%であった一方で、rhNRG-1 を注射した後、マウスは、85%および80% (30 μg/kg) ならびに70%および65% (15 μg/kg) まで上昇した。

## 【0 2 4 3】

(表 2 5 . ウイルス (I) に感染したマウスの生存率に対する rhNRG-1 の効果)

## 【0 2 4 4】

## 【表 2 5】

群	薬物投与	生存動物数 (相対的生存率 %)							
		1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目	7日目	死亡
標準コントロール群 (n=10)		10	10	10	10	10	10	10	10**
モデル (n=20)		20	20	20	18	17	14	11	10
rhNRG-1 β 30μg/kg (n=20)	iv qd×5	100%	100%	100%	90%	85%	70%	55%	50%
rhNRG-1 β 15μg/kg (n=20)	iv qd×5	100%	100%	100%	100%	100%	90%	85%	80%
rhNRG-1 β 5μg/kg (n=20)	iv qd×5	100%	100%	100%	100%	95%	85%	70%	65%
標準コントロール群 (n=20)		20	20	20	20	20	20	20	20**
標準コントロール群 (n=20)		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

30

40

上記のデータを、SPSSソフトウェア、Survival Life Tables 分析により処理した (コントロール群と比較した場合、\* P < 0.05、\*\* P < 0.01)。

## 【0 2 4 5】

(表 2 6 . ウイルス (II) に感染したマウスの生存率に対する rhNRG-1 の効

50

果)

【0246】

【表26】

群	薬物投与	生存動物数 (相対的生存率 %)							
		1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目	7日目	死亡
標準コントロール群		10	10	10	10	10	10	10	10**
(n=10)		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
モデル群	iv qd×5	20	20	20	18	15	13	10	10
(n=20)		100%	100%	100%	90%	75%	65%	50%	50%
rhNRG-1β	iv qd×5	20	20	20	20	19	18	17	17*
30μg/kg (n=20)		100%	100%	100%	100%	95%	90%	85%	85%
rhNRG-1β	iv qd×5	20	20	20	19	18	16	13	13
15μg/kg (n=20)		100%	100%	100%	95%	90%	80%	65%	65%
		20	20	20	18	17	14	11	10
rhNRG-1β	iv qd×5	20	20	20	18	17	14	11	10
7.5μg/kg (n=20)									
rhNRG-1β		20	20	20	20	20	20	20	20**
7.5μg/kg (n=20)		100%	100%	100%	90%	85%	70%	55%	50%
		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

10

20

上記のデータを、SPSSソフトウェア、Survival Life Tables 分析により処理した(コントロール群と比較した場合、\* P < 0.05、\*\* P < 0.01)。

【0247】

(9. 結論)

30 μg/kg および 15 μg/kg の rhNRG-1 群の EF 値 (90.2 ± 2.5%、86.0 ± 2.9%) および FS 値 (55.7 ± 2.1%、50.7 ± 4.3%) は、有意に上昇し、モデル群と比較した場合、有意差があり (P < 0.02)、LVDD 値 (0.187 ± 0.006、0.189 ± 0.008) および LVDS 値 (0.085 ± 0.009、0.099 ± 0.027) の両方は、モデル群 (0.208 ± 0.015、0.142 ± 0.020) より低かった (P < 0.05); rhNRG-1 は、モデル群動物の心筋の病理的損傷の重篤度を緩和することができ、血清トロポニン I (cTnI) レベルを有効に減少させ、30 μg/kg 用量レベル群 (7.98 ± 6.07 ng/ml) および 15 μg/kg 用量レベル群 (19.43 ± 10.76 ng/ml) の cTnI 含有量は、モデル群 (44.44 ± 12.39 ng/ml) より有意に低く、それらの間に有意差があった (P < 0.001、P < 0.005); 30 μg/kg の rhNRG-1 は、モデル群動物の生存率を有意に改善でき、モデル群動物の生存率 50% と比較した場合、80% に達した (P < 0.05)。

30

40

【0248】

実験の結果により、rhNRG-1 の 30 μg/kg 用量レベルにより、マウスのウイルス感染により引き起こされた急性心筋傷害を有効に処置し得ることが示された。

【0249】

(実施例5. ウイルス感染 (II) により引き起こされたマウスの急性心筋傷害に対する rhNRG-1 の治療的効果に対する観察)

(1. 緒言)

(目的) ウイルス感染により引き起こされたマウスの急性心筋傷害の処置における r

50

hNRG-1 の薬物投与の効率的時間を研究すること。(方法) 急性心筋傷害動物モデルを、コクサッキーB<sub>3</sub>ウイルス(CVB<sub>3</sub>)のマウスにおける腹腔内感染を介して樹立した。このモデル動物を、無作為に群分けし(すなわち、通常コントロール群、モデル群、試験薬物群)、20匹の動物を、各群に割り当てた。30μg/kgのrhNRG-1を、それぞれ連続して3日間、5日間および7日間尾静脈に注射した。実験の間、動物の生存率をモニターし、心エコー検査を7日目に行って、動物を8日目に屠殺した。血清をcTnIレベル決定のために分離し、心臓病理組織学的検査を行った。(結果) 30μg/kgのrhNRG-1の3日間、5日間および7日間の連続注射により、EF/FS値を上昇させることができ、5日間および7日間試験薬物群のEF/FS値(86.8±4.4%/51.9±5.8%、87.0±3.3%/51.8±5.1%)と、モデル群のEF/FS値(66.5±5.6/31.8±3.7)とを比較すると、有意差が存在し(P<0.001)、5日間および7日間試験薬物群のLVD値は、有意に減少し(それぞれ、0.090±0.011、0.092±0.012cmである)、モデル群(0.133±0.012)と比較した場合、有意差があった(P<0.01); rhNRG-1は、心筋の病理学的損傷の重篤度を緩和することができ、モデル動物の血清トロポニンI(cTnI)レベルを有効に減少させ、5日間試験薬物群のcTnI(1.06±1.32ng/ml)および7日間試験薬物群のcTnI(1.05±1.2ng/ml)は、モデル群より有意に低かった(23.54±16.96ng/ml)P<0.01; rhNRG-1の連続5日間および7日間の注射は、動物の生存率を有意に改善することができ、モデル動物の生存率50%と比較した場合、85%に達した(P<0.05)。(結論) 連続5日間注射した30μg/kgのrhNRG-1は、ウイルス感染によって引き起こされたマウスにおける急性心筋傷害を有効に処置することができた。

#### 【0250】

##### (2. 目的)

ウイルス感染によって引き起こされたマウスの急性心筋傷害の処置におけるrhNRG-1の薬物投与の有効時間を明らかにすること。

#### 【0251】

##### (3. 試験薬物)

rhNRG-1 (Zensun (Shanghai) Science & Technology Development. バッチ番号: 200110006-2、力価: 5000u; 純度: >95% (HPLC-C8) によって提供)

##### (5. 実験動物)

5.1 種、供給源および能力の確認: 4週齢の純系BALB/Cマウス (Experiment Animal Department of Fudan University により提供、動物能力の確認数: Yi Dong Zi 22-9)

5.2 体重および性別: 13~15g、雄性。

#### 【0252】

5.3 各群の動物数: 各実験群において20匹の動物、通常コントロール群において10匹。

#### 【0253】

##### (5. ウイルス)

前節において記載されたものと同じ。

#### 【0254】

##### (6. 試薬および装置)

前節において記載されたものと同じ。

#### 【0255】

##### (10. 実験方法)

##### 10.1 実験群分け

通常マウスコントロール群、モデル群および試験薬物群を設定した;

10

20

30

40

50

通常マウスコントロール群 (n = 10) ;

モデル群 (n = 20) : 調製済み緩衝溶液を注射した ;

試験薬物群 (n = 20) : 30 µg / kg の rhNRG - 1 を、3つの異なる治療過程として、連続して3日間、5日間および7日間投与し、各群につき20匹の動物を割り当てた ;

ブラシーボコントロール群 (n = 20) : 非CVB3凍結融解細胞上清 (0.2 ml / 動物) の腹腔内注射。

#### 【0256】

10.2 用量設定、試験薬物の調製、薬物投与経路、薬物投与時間、試験薬物の濃度および容量

rhNRG - 1 を、調製緩衝溶液 (10 mM PB、0.2% ヒト血清アルブミン、必要な濃度まで5% マンニトール) で希釈した ; 3つの薬物投与群を設定し、連続3日間、5日間および7日間の、各用量の薬物容積0.2 ml / 動物の静脈内注射を行った。

#### 【0257】

モデル群の薬物投与は、マウスの尾静脈への静脈内注射であった (毎日1回 (qd)、連続7日間、各用量に対する薬物容量は、0.2 ml / 動物であった)。

#### 【0258】

##### 7.3 実験方法

##### 7.3.1 マウスにおける急性ウイルス心筋炎動物モデルの設定

100 × TCID<sub>50</sub> CVB<sub>3</sub> (Fudan Universityの附属機関であるZhong Shan Hospitalによって提供された) を0.2 ml、腹腔内に注射し、心筋炎モデルを樹立した。翌週内に、そのマウスは、立毛、脱毛、やせ、無気力および死亡を発現し、試験動物の約半数は、8日目に死亡した。

#### 【0259】

##### 7.3.2 薬物動態実験

前節において記載されたものと同じ。

#### 【0260】

##### 7.3.3 観察指数

前節において記載されたものと同じ。

#### 【0261】

##### (8. データ処理)

データ処理のために、関連データの両側 t 検定を使用した。

#### 【0262】

##### (9. 結果)

9.1 3日間、5日間および7日間投与された rhNRG - 1 の、ウイルスに感染したマウスの心機能に対する効果)

結果により、EF / FS 値 (66.5 ± 5.6% / 31.8 ± 3.7%) が、通常群 (93.5 ± 0.9% / 68.1 ± 1.3%) より有意に低く、その差は、統計学的に有意であった (P < 0.01)。連続5日間および7日間の rhNRG - 1 注射の EF / FS 値 (86.8 ± 4.4% / 51.9 ± 5.8%、87.0 ± 3.3% / 51.8 ± 5.1%) は、モデル群とは有意に異なった (P < 0.001)。連続3日間の rhNRG - 1 注射の EF 値は、再び上昇した (73.1 ± 6.6%) が、モデル群と比較した場合、有意差はなかった (P < 0.05)。

#### 【0263】

LVD 値 (0.133 ± 0.012 cm) は、通常群 (0.059 ± 0.006 cm) より高く、それらの間には有意差があった (P < 0.01)。rhNRG - 1 の5日間投与群および7日間投与群の LVD 値は、有意に減少し (それぞれ、0.090 ± 0.011、0.092 ± 0.012 cm)、モデル群とは有意に異なった (P < 0.001)。rhNRG - 1 の3日間投与群の LVD 値 (0.123 ± 0.012 cm) は、モデ

10

20

30

40

50

ル群とは有意に異なった ( $P < 0.05$ )。表 27 および 17 ~ 28 は、2つの実験の結果を示す。

【0264】

(表 27 . ウイルス (I) に感染したマウスの心機能に対する異なる日数投与した rhNRG-1 の効果)

【0265】

【表 27】

群	薬物投与 レジメン	LVDd(cm)	LVDs(cm)	EF(%)	FS(%)
標準コントロール群		0.179*	0.059**	93.5**	68.1**
		±0.007	±0.006	±0.9	±1.3
モデル群	iv qd × 7	0.194	0.133	66.5	31.8
		±0.012	±0.012	±5.6	±3.7
rhNRG-1 β	iv qd × 3	0.194	0.123	73.1	36.7
30μg /kg		±0.008	±0.012	±6.6	±4.7
rhNRG-1 β	iv qd × 5	0.187	0.090**	86.8**	51.9**
30μg /kg		±0.006	±0.011	±4.4	±5.8
rhNRG-1 β	iv qd × 7	0.192	0.092**	87.0**	51.8**
30μg /kg		±0.008	±0.012	±3.3	±5.1

10

20

上記データの各々において (各群  $n = 6$ )、SPSS 一元配置分散分析によって、モデル群と比較 (\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$ )。

【0266】

(表 28 . ウイルス (II) に感染したマウスの心機能に対する異なる日数投与した rhNRG-1 の効果)

【0267】

【表 28】

群	薬物投与 レジメン	LVDd(cm)	LVDs(cm)	EF(%)	FS(%)
標準コントロール群		0.189**	0.080**	90.9**	57.5**
		±0.008	±0.007	±2.6	±3.5
モデル群	iv qd × 7	0.206	0.126	75.4	39.0
		±0.008	±0.006	±5.2	±4.3
rhNRG-1 β	iv qd × 3	0.211	0.121	81.0	43.9
30μg /kg		±0.016	±0.016	±5.4	±5.1
rhNRG-1 β	iv qd × 5	0.199	0.100*	85.8**	50.0**
30μg /kg		±0.000	±0.014	±4.205	±6.350
rhNRG-1 β	iv qd × 7	0.194	0.092**	87.283**	52.367**
30μg /kg		±0.017	±0.008	±1.694	±1.847

30

40

上記データの各々において (各群  $n = 6$ )、SPSS 一元配置分散分析によって、モデル群と比較 (\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$ )。

【0268】

(9.2 ウイルスに感染したマウスの血清 cTnI に対する rhNRG-1 の効果)

結果により、通常群の cTnI の平均 ( $0.12 \pm 0.03$  ng/ml) およびモデル群の cTnI の平均は、有意に上昇し ( $23.54 \pm 16.96$  ng/ml)、それらの間には有意差がある ( $P < 0.001$ ) ことが示された。cTnI 値は、rhNRG-1

50

の5日間投与群および7日間投与群の両方とも、有意に減少し(それぞれ、 $1.06 \pm 1.32 \text{ ng/ml}$ 、 $1.05 \pm 1.20 \text{ ng/ml}$ である)、モデル群とは有意に異なった( $P < 0.001$ )。その差は、3日間薬物投与群とモデル群との間は有意でなかった( $P > 0.05$ )。表29および30は、2つの実験の結果を示した。

【0269】

(表29. ウイルス(I)に感染したマウスにおける血清cTnI( $\text{ng/ml}$ )に対するrhNRG-1の効果)

【0270】

【表29】

群 n=9)	薬物投与レジメン	cTnI(ng/ml) 平均 ± 標準偏差
標準コントロール群		0.12 ± 0.03**
モデル群	iv qd×7	23.54 ± 16.96
rhNRG-1 β 30μg/kg	iv qd×3	13.37 ± 9.53
rhNRG-1 β 30μg/kg	iv qd×5	1.06 ± 1.32**
rhNRG-1 β 30μg/kg	iv qd×7	1.05 ± 1.20**

10

20

上記データの各々を、モデル群と比較した場合(\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$ )、SPSSソフトウェアの非母数検定(独立サンプル検定)によって分析した。

【0271】

(表30. ウイルス(II)に感染したマウスにおける血清cTnI( $\text{ng/ml}$ )に対するrhNRG-1の効果)

【0272】

【表30】

群 n=8)	薬物投与レジメン	cTnI(ng/ml) 平均 ± 標準偏差
標準コントロール群		0.15 ± 0.03**
モデル群	iv qd×7	30.13 ± 21.75
rhNRG-1 β 30μg/kg	iv qd×3	12.32 ± 18.36
rhNRG-1 β 30μg/kg	iv qd×5	0.44 ± 0.24**
rhNRG-1 β 30μg/kg	iv qd×7	0.51 ± 0.28**

30

40

上記データの各々を、モデル群と比較した場合(\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$ )、SPSSソフトウェアの非母数検定(独立サンプル検定)によって分析した。

【0273】

(9.3 ウイルスに感染したマウスの心筋の病理的傷害に対する異なる日数投与したrhNRG-1の効果)

実験結果により、通常群の病理的スコアが $0.0 \pm 0.00$ であり、モデル群の病理的スコアが増大し( $1.44 \pm 1.19$ )、これらの間には有意差があり( $P < 0.01$ )、rhNRG-1の5日間投与群および7日間投与群の病理的スコアは有意に減少し(それぞれ、 $0.11 \pm 0.14$ および $0.13 \pm 0.13$ である)、モデル群とは有意に

50

異なる ( $P < 0.01$ ) ことが示された。3日間薬物投与群の心筋傷害もまた改善され ( $0.33 \pm 0.155$ )、モデル群と比較した場合、有意差があったが、5日薬物投与群の心筋細胞の改善は、3日間薬物投与群より顕著に良好であり、それらの間には有意差があった ( $P < 0.01$ ) が、その一方で、5日間薬物投与群と7日間薬物投与群との間には病理的スコアに有意差はなかった。

## 【0274】

表31、32および図21および24は、2つの実験の結果を示した。

## 【0275】

(表31. ウイルス(I)に感染したマウスにおける心筋の病理学的変化に対する異なる日数投与された rhNRG-1 の効果)

10

## 【0276】

## 【表31】

群	薬物投与レジメン	病理学的スコア (平均±標準偏差)
標準コントロール群		0.00±0.00 **
モデル群	iv qd×7	1.44±1.19
rhNRG-1 β 30μg/kg	iv qd×3	0.33±0.155*
rhNRG-1 β 30μg/kg	iv qd×5	0.11±0.140**
rhNRG-1 β 30μg/kg	iv qd×7	0.13±0.132**

20

上記データの各々を、モデル群と比較した場合 ( $* P < 0.05$ 、 $** P < 0.01$ )、SPSSソフトウェアの非母数検定 (独立サンプル検定) によって分析した。

## 【0277】

(表32. ウイルス(II)に感染したマウスにおける心筋の病理学的変化に対する異なる日数投与された rhNRG-1 の効果)

## 【0278】

## 【表32】

群 (n=10)	薬物投与レジメン	病理学的スコア (平均±標準偏差)
標準コントロール群		0.00±0.00 **
モデル群	iv qd×7	1.86±1.20
rhNRG-1 β 30μg/kg	iv qd×3	0.55±0.476*
rhNRG-1 β 30μg/kg	iv qd×5	0.17±0.157**
rhNRG-1 β 30μg/kg	iv qd×7	0.19±0.168**

30

上記データの各々を、モデル群と比較した場合 ( $* P < 0.05$ 、 $** P < 0.01$ )、SPSSソフトウェアの非母数検定 (独立サンプル検定) によって分析した。

40

## 【0279】

(9.4 ウイルスに感染したマウスの生存率に対する rhNRG-1 の効果)

表33および34は、2つの実験の結果を示し、モデル群のマウスの生存率は、それぞれ、50%および55%であったが、その一方で、rhNRG-1 の5日間投与群および7日間投与群両方の生存率は、85%および80%まで上昇し、モデル群と比較した場合、有意差があった ( $P < 0.05$ )。3日間群の生存率は、65%および75%まで上昇したが、モデル群と比較した場合に、有意差はなかった ( $P < 0.05$ )。

## 【0280】

(表33. ウイルス(I)に感染したマウスにおける生存率に対する異なる日数投与さ

50

れた rhNRG-1 の効果)

【0281】

【表33】

群	薬物投与	生存動物数 (相対的生存率 %)							死亡
		1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目	7日目	
標準コントロール群 (n=10)		10	10	10	10	10	10	10	10**
モデル群 n=20	iv qd×7	20	20	20	18	16	13	10	10
		100%	100%	100%	90%	80%	65%	50%	50%

10

rhNRG-1 β 30μg/kg(n=20)	Iv qd×3	20	20	20	19	18	16	14	13
		100%	100%	100%	95%	90%	80%	70%	65%
rhNRG-1 β 30μg/kg(n=20)	iv qd×5	20	20	20	20	19	19	18	17*
		100%	100%	100%	100%	95%	95%	90%	85%
rhNRG-1 β 30μg/kg(n=20)	iv qd×7	20	20	20	20	20	19	19	17*
		100%	100%	100%	100%	100%	90%	90%	85%

上記群の各々を、SPSSソフトウェアのSurvival Life Tables 分析により処理した(コントロール群と比較した場合、\* P < 0.05、\*\* P < 0.01)。

20

【0282】

(表34. ウイルス(II)に感染したマウスにおける生存率に対する異なる日数投与された rhNRG-1 の効果)

【0283】

【表34】

群	薬物投与	生存動物数 (相対的生存率 %)							死亡
		1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目	7日目	
標準群 n=10		10	10	10	10	10	10	10	10**
モデル群 n=20	iv qd×7	20	20	20	18	17	14	12	12
		100%	100%	100%	90%	85%	70%	60%	60%
rhNRG-1 β 30μg/kg(n=20)	iv qd×3	20	20	20	20	19	16	15	15
		100%	100%	100%	100%	95%	80%	75%	75%
rhNRG-1 β 30μg/kg(n=20)	iv qd×5	20	20	20	20	19	19	18	18*
		100%	100%	100%	100%	95%	95%	90%	90%
rhNRG-1 β 30μg/kg(n=20)	iv qd×7	20	20	20	20	20	19	18	18*
		100%	100%	100%	100%	100%	95%	90%	90%

30

上記群の各々を、SPSSソフトウェアのSurvival Life Tables 分析により処理した(コントロール群と比較した場合、\* P < 0.05、\*\* P < 0.01)。

40

【0284】

(10. 結論)

連続して3日間、5日間、および7日間の間静脈内注射した30μg/kgのrhNRG-1は、すべて、EF/F S値を上昇させ得、5日間および7日間の群についての薬物投与のEF/F S値(86.8 ± 4.4% / 51.9 ± 5.8% / 87.0 ± 3.3% / 51.8% ± 5.1%)は、モデル群のEF/F S値(66.5 ± 5.6 / 31.8 ± 3.7)とは有意に異なり(P < 0.01)、5日間群および7日間群の両方のLVDは

50

、有意に減少し(それぞれ、 $0.090 \pm 0.011$  および  $0.092 \pm 0.012$  cm である)、モデル群の LVD ( $0.133 \pm 0.012$ ) とは有意に異なった ( $P < 0.01$ ) ; rhNRG-1 は、モデル動物において心筋の病理学的損傷の重篤度を改善し得、血清トロポニン I (cTnI) レベルを有効に減少させ、5日間群についての薬物投与の cTnI ( $1.06 \pm 1.32$  ng/ml) および 7日間群についての薬物投与の cTnI ( $1.05 \pm 1.2$  ng/ml) は、モデル群の cTnI ( $23.54 \pm 16.96$  ng/ml) よりも有意に低かった ( $P < 0.01$ ) ; 連続して5日間および7日間の間静脈内注射した rhNRG-1 は、モデル動物の生存率を有意に上昇させ得、これは、85%に達した。  $P < 0.05$ 。

#### 【0285】

この実験結果は、連続して5日間投与した  $30 \mu\text{g}/\text{kg}$  の rhNRG-1 は、ウイルスにより感染したマウスにおいて急性心筋損傷を有効に処置し得ることを実証した。

#### 【0286】

(実施例6. 下大静脈狭窄により引き起こされる鬱血性心不全に対する rhNRG-1 の治療効果)

##### (1. 要旨)

(目的) イヌにおいて下大静脈狭窄により引き起こされる鬱血性心不全に対する rhNRG-1 の治療効果を研究すること。(方法) 約1週間にわたる50%の下大静脈狭窄の後、EF値が約20%減少したか、または心エコー検査により心拍出量が20%減少した。このことは、安定な低拍出量の鬱血性心不全動物モデルが確立されたことを示した。その後、これらの動物を、各群について6匹のイヌを含む群へとランダムに分割し、3つの投与量レベルの rhNRG-1 (すなわち、 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $3 \mu\text{g}/\text{kg}$  および  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) を、連続5日間にわたり毎日静脈内注射した。心機能(心エコー検査)決定を、この薬物投与後に実施した。モデル動物における種々の血流力学的パラメーターを、頸静脈カテーテル法および頸動脈カテーテル法をそれぞれ介して分析した。(結果)

連続5日間にわたり投与したこれら3つの投与量レベルの rhNRG-1 ( $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $3 \mu\text{g}/\text{kg}$  および  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) はすべて、モデル動物の EF/FS 値および心拍出量(CO)を上昇させ得た。薬物投与前の値と薬物投与後の値との間およびモデル群の値の間で、有意な差異が存在した ( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ )。  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $3 \mu\text{g}/\text{kg}$  および  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  の rhNRG-1 は、モデル動物における左心室の dp/dt を有効に上昇させ得た。モデル群の左心室の dp/dt と比較した場合に、有意な差異 ( $P < 0.01$ ) が存在した。上記 rhNRG-1 は、モデル動物の LVPmax を有効に上昇させ得、LVPmin 値を減少させ得、このモデル群と比較した場合に  $P < 0.04$  であったが、右心室に対する影響は、明らかではなかった。(結論) rhNRG-1 は、イヌにおいて下大静脈の狭窄により引き起こされる鬱血性心不全を有効に処置し得た。

#### 【0287】

##### (2. 目的)

イヌにおいて下大静脈の狭窄により引き起こされる鬱血性心不全に対する rhNRG-1 の治療効果を示すこと。

#### 【0288】

##### (3. 試験サンプル)

Zensun (Shanghai) Science & Technology Development により提供される rhNRG-1 。バッチ番号: 200110006-2; 濃度:  $500 \mu\text{g}/\text{アンプル}$ ; 力価:  $5000 \text{u}/\text{アンプル}$ ; 純度:  $> 95\%$  (HPLC-C8)。

#### 【0289】

##### (6. 実験動物)

6.1 (種、供給源および適任証明書): Zhong Shan Hospital of Fudan University により提供される交配種のイヌ。Exper

10

20

30

40

50

iment Department of Fudan Universityにより保証された適格さである。

【0290】

6.2 (体重および性別) : 13 ~ 18 kg、雄

6.3 (各群における動物数) : 各実験群において6匹の動物。

【0291】

(5. 材料および器具)

5.1 心エコー検査装置、Hewlett Packard sonos 5500 ; プローブの型 : S4

5.2 注射用水、Zang Jiang Antus Bioproduct Co Ltd, 10 x 5 ml、パッチ番号 : 0112180 ;

5.3 高振動数電気ナイフ、Shanghai Hu Tong electronic equipment factory, GD350-D ;

5.4 心電図レコーダー、Nihon Kohden ECG-6511 ;

5.5 モニタリング電極、Ludlow Company of Canada、モデル : MT-200 ;

5.6 生理学レコーダー、Equipment Research Center of Shanghai Medical University、SMUP-B ;

5.7 電気ベンチレーター、Shanghai No.4 Medical Equipment Factory ;

5.8 三叉バルーンフローティングカテーテル、Edwards 114F7 .

(6. 実験方法)

(6.1 実験グループ分け)

偽手術群、モデル群、および試験薬物群を、設定した。

【0292】

偽手術群 (n = 6) : 開胸 (但し、下大静脈の狭窄を伴わない) を実行した。

【0293】

モデル群 (n = 6) : 調製した緩衝溶液を、心不全モデルの確立後に注射した。

【0294】

試験薬物群 : rhNRG-1 を、心不全モデルの確立後に注射した。

【0295】

(6.2 投与量設定、試験薬物の調製、薬物投与レジメン)

それぞれ、 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $3 \mu\text{g}/\text{kg}$  および  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  の高投与レベル、中投与レベルおよび低投与レベルの rhNRG-1 を、調製緩衝溶液 (ビヒクル) を用いて必要な濃度まで希釈し、連続5日間にわたり毎日1回静脈内注射した。

【0296】

調製緩衝溶液を、モデル群について連続5日間にわたり1日1回静脈内注射した。

【0297】

投与した薬物の容積は、 $0.8 \text{ ml}/\text{kg}$  体重であった。

【0298】

(6.3 実験方法)

(6.3.1 イヌにおける下大静脈動物モデルの狭窄により引き起こされる心不全の設定)

3%のペントバルビタールナトリウム ( $30 \text{ mg}/\text{kg}$ ) を、イヌを麻酔するために末梢静脈中に注射し、その後、気管に挿管した。第4肋骨と第5肋骨との間で右胸を經由して無菌開胸し、右心耳から3cmにて下大静脈の周囲を測定した。下大静脈の円周の  $1/3 \sim 1/2$  の円周を有する硬いスプール (spool) を選択し、そのスプールと下大静脈とを #7 絹糸で一緒に締め、そのスプールを伸ばし、出血をすべて停止させ、胸を閉じた。1週間育てた後、心エコー検査を、腹水の量に従って実施した。EFが約20%減少した時、または左心の拡張が約20%減少した時、安定な低拍出量のうっ血性心不全動物

モデルが、確立された。その後、上記薬物の静脈内注射を、連続 5 日間実行した。下大静脈を狭窄することのない開胸術を、偽手術群について実行した。

【0299】

(6.3.2 薬力学的実験)

動物モデルの確立を同定した後に、動物グループ分けおよび薬物投与レジメンに従って、実験を実行した。

【0300】

(6.3.3 観察指標)

心機能指標の決定を、手術前、薬物投与前および薬物投与の 5 日間後に、そのイヌを麻酔して実行した。主要な指標としては、以下が挙げられた：

EF (駆出率)：心臓の駆出率 (すなわち、左室拡張末期容積 (EDV) と左室収縮末期容積 (ESV) との間の差異と、左室拡張末期容積との比) であり、これは、心室のポンプ機能を反映する (特に、収縮機能を反映する) ために使用される一般的指標である；

FS：心室内径短縮率 (これは、心室の収縮機能を反映する指標である)

CO：心拍出量 (すなわち、1 分間につき心臓により駆出される血液容積)。

【0301】

(6.3.3.2 血行力学的指標の決定)

7F 三叉バルーンフローティングカテーテルを、右頸静脈中に挿入し、右心耳圧、右心室圧、肺圧および肺動脈楔入圧を、記録した。6F 三叉バルーンフローティングカテーテルをまた、左頸動脈中に挿入し、大動脈圧および左心室圧を、以下の主要指標とともに生理機能レコーダーを用いて記録した：LV P max、LV P min、+ dp / dt、および - dp / dt。

【0302】

(7. データ処理)

SPSS ソフトウェアを用いて、収集したデータの両側 t 検定またはノンパラメトリック検定を、実行した。

【0303】

(8. 結果)

(8.1 TIVCC イヌの心機能に対する rhNRG-1 の効果)

(8.1.1 TIVCC イヌの左室 EF / FS 値に対する rhNRG-1 の効果)

モデル動物における狭窄の前の EF および FS の値は、心エコー検査を介して、それぞれ、 $82.3 \pm 1.6\%$  および  $49.2 \pm 2.6\%$  であり、手術後に、それぞれ、 $59.1 \pm 7.3\%$  および  $29.3 \pm 3.9\%$  にまで減少した。狭窄前と狭窄後との間には、有意な差 ( $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ ) が存在した。EF および FS の値は、5 日間後に  $55.5 \pm 10.9\%$  および  $28.5 \pm 6.6\%$  のレベルで継続して維持された。このことは、下大静脈の狭窄を介して、鬱血性心不全イヌモデルが確立され、そしてそれが比較的安定であったことを示した。

【0304】

rhNRG-1 注射後の 3 つすべての投与量レベル群の EF および FS の値は有意に上昇した。低投与量レベル群 ( $1 \mu\text{g} / \text{kg}$ ) の EF および FS は、 $57.7 \pm 10.9$  および  $30.6 \pm 8.0$  から、 $70.4 \pm 8.4$  および  $39.7 \pm 5.7$  へと増加した。薬物投与前と薬物投与後との間には有意な差 ( $P < 0.05$ ) が存在した。一方、モデル群と比較した場合には、有意な差 ( $P < 0.05$ ) が存在した。さらに、中間投与レベル群のモデル動物の EF / FS 値および高投与レベル群のモデル動物の EF / FS 値は、有意に増加した。そして、薬物投与前および薬物投与後の EF / FS 値を、モデル群の EF / FS 値と比較した場合に、有意な差 ( $P < 0.01$ ) が存在した。表 35 は、これらの結果を示した。

【0305】

(表 35. TIVCC イヌにおける左室の EF / FS に対する rhNRG-1 の効果)

10

20

30

40

50

【 0 3 0 6 】

【 表 3 5 】

群	FS (%)			EF (%)		
	前操作	薬物投与前	薬物投与後	前操作	薬物投与前	薬物投与後
擬操作群	51.7±2.2	47.4±1.3**	50.3±2.2**	84.1±1.4	81.4±1.1**	83.1±1.6**
モデル群	49.2±2.6	29.3±3.9	28.5±6.6	82.3±1.6	59.1±7.3	55.5±10.9
rhNRG-1 β 10μg/kg	50.5±3.3	27.7±5.6	41.5±3.1***▲	82.9±2.6	55.8±10.0	74.7±3.2***▲
rhNRG-1 β 3μg/kg	51.7±2.9	29.9±6.4	42.4±4.4***▲	84.7±2.8	58.0±8.3	74.7±4.6***▲
rhNRG-1 β 1μg/kg	50.8±4.0	30.6±8.0	39.7±5.7*▲	82.8±3.0	57.7±10.9	70.4±8.4*▲

10

上記の群のすべて、n = 6

\* モデル群と比較した場合に、 $P < 0.05$  ; \*\* モデル群と比較した場合に、 $P < 0.01$  ; (黒三角)薬物投与前および薬物投与後と比較した場合に、 $P < 0.05$  (黒三角2つ)薬物投与前および薬物投与後と比較した場合に、 $P < 0.01$ 。

【 0 3 0 7 】

( 8 . 1 . 2 T I V C C イヌの心拍出量 ( C O ) に対する r h N R G - 1 の効果 )  
表 3 6 は、r h N R G - 1 は、モデル動物の心拍出量を有意に増加し得ることを示した。1 μ g / k g の r h N R G - 1 群の心拍出量は、 $2.4 \pm 0.5$  から  $3.7 \pm 0.8$  へと増加した。薬物投与前および薬物投与後を比較した場合に、有意な差 ( $P < 0.05$ ) が存在した。一方、モデル動物と比較した場合にもまた、有意な差 ( $P < 0.05$ ) が存在した。3 μ g / k g 投与量レベル群および 10 μ g / k g 投与量レベル群の C O 変化は、なお有意であった ( $P < 0.01$ )。心拍数変化決定の結果は、r h N R G - 1 が、心拍数に対してそれほど影響を有さないことを示した (詳細は明らかにならなかった)。

20

【 0 3 0 8 】

( 表 3 6 . T I V C C イヌの心拍量 ( L m i n ) に対する r h N R G - 1 の効果 )

【 0 3 0 9 】

30

【 表 3 6 】

群	CO (L/分)		
	前操作	薬物投与前	薬物投与後
擬操作群	4.3±0.7	3.9±0.6	4.0±0.6**
モデル群	4.7±1.3	2.5±0.8	2.7±0.5
rhNRG-1 β 10μg/kg	4.3±0.6	1.9±0.3	3.6±0.7***▲▲
rhNRG-1 β 3μg/kg	4.3±0.8	2.1±0.7	4.0±0.9*▲▲
rhNRG-1 β 1μg/kg	4.2±0.6	2.4±0.5	3.7±0.8*▲

40

上記の群のすべて、n = 6。

\* モデル群と比較した場合に、 $P < 0.05$  ; \*\* モデル群と比較した場合に、 $P < 0.01$  ; (黒三角)薬物投与前および薬物投与後と比較した場合に、 $P < 0.05$  (黒三角2つ)薬物投与前および薬物投与後と比較した場合に、 $P < 0.01$ 。

【 0 3 1 0 】

( 8 . 2 T I V C C イヌの血流力学に対する r h N R G - 1 の効果 )

左室および右室の  $dp/dt$  の変化および収縮期末期圧 / 拡張末期圧の変化を、フローティングカテーテル法技術を用いて決定した。その結果は、1 μ g / k g、3 μ g / k g および 10 μ g / k g の r h N R G - 1 が、動物の左室  $dp/dt$  を有効に増加し得たことを示した。モデル群と比較した場合に、有意な差 ( $P < 0.05$ ) が存在した。これ

50

らの  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $3 \mu\text{g}/\text{kg}$  および  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  の rhNRG-1 は、モデル群と比較した場合 ( $P < 0.05$ ) に、LVPmax 値を有効に上昇させ、LVPmin 値を減少させた。rhNRG-1 は、左心 dp/dt、左室 + dp/dt および左室末期圧に対して、それほど効果を有さない。表 37 および表 38 は、結果を詳細に示す。

【0311】

(表 37 . TIVCCI の左室 dp/dt に対する rhNRG-1 の効果)

【0312】

【表 37】

群	L(+dp/dt) (mmHg/s)	L(-dp/dt) (mmHg/s)
擬操作群	5088.99±982.87**	-3233.39±923.82
モデル群	2017.75±295.25	-2384.94±1062.31
rhNRG-1 $\beta$ 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	5104.88±1332.05**	-3658.34±1390.97
rhNRG-1 $\beta$ 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$	5000.45±1535.88**	-3249.52±973.32
rhNRG-1 $\beta$ 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	4024±1006 635.63**	-2933±613.44

10

上記の群のすべて、 $n = 6$ 。

\* モデル群と比較した場合に、 $P < 0.05$  ; \*\* モデル群と比較した場合に、 $P < 0.01$ 。

【0313】

(表 38 . TIVCCI の左室 LVPmax / LVPmin に対する rhNRG-1 の効果)

【0314】

【表 38】

群	LVPmax (mmHg)	LVPmin (mmHg)
擬操作群	145.04±15.17**	-0.03±6.48
モデル群	95.07±11.62	2.42±2.86
rhNRG-1 $\beta$ 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	122.87±17.37*	-0.69±1.05*
rhNRG-1 $\beta$ 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$	114.68±17.12*	-1.12±1.34*
rhNRG-1 $\beta$ 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	102.12±12.42	0.59±3.05

20

30

上記の群のすべて、 $n = 6$ 。

\* モデル群と比較した場合に、 $P < 0.05$  ; \*\* モデル群と比較した場合に、 $P < 0.01$ 。

【0315】

(10 . 結論)

連続5日間にわたって投与した3つの投与量レベル ( $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $3 \mu\text{g}/\text{kg}$  および  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) すべての rhNRG-1 は、モデル動物の EF / FS 値および心拍出量 (CO) を上昇させ得た。薬物投与前を薬物投与後と比較した場合に、有意な差が存在した ( $P < 0.005$ 、 $P < 0.01$ ) ;  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、および  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  の rhNRG-1 は、左室 dp/dt を有効に増加させ得た。モデル群と比較した場合に、有意な差 ( $P < 0.05$ ) が存在した。これらの  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、および  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  の rhNRG-1 は、モデル動物の LVPmax を有効に上昇させ得、LVPmin を減少させ得る。モデル群と比較した場合に、有意な差異が存在した ( $P < 0.05$ )。一方、右室に対しては、それほど影響は存在しなかった。

40

【0316】

これらの実験の結果は、rhNRG-1 が、下大静脈の狭窄により引き起こされる鬱血性心不全を有効に処置し得ることを示した。

50

## 【0317】

(実施例7. 組換えヒトニューレギュリン - 1 S177 ~ Q237の注射についてのアカゲザル長期毒性研究)

## (要旨)

アカゲザルに対する注射について、7.5g/日、15g/日、75g/日の組換えヒトニューレギュリン - 1 S177 ~ Q237の静脈内注射に関する長期毒性実験(使用した投与量は、マウス薬力学モデルにおける有効投与量に基づき、サルの投与量の2倍、4倍、20倍に等しい投与量に変換され、イヌの薬力学モデルに基づいて、サルについての投与量の4倍、5倍、9倍および45倍と等しい投与量に変換された)。賦形剤をコントロールとして使用した。モニタリングを、退薬3週間後に連続して実行した。注射について10の組換えヒトニューレギュリン - 1 S177 ~ Q237の毒性反応および生物に対するその重症性を研究して、毒性反応の標的器官および損傷の可逆性を探索し、そして毒性反応を引き起こさない投与量を決定し、そしてヒトにおいて使用されるべき安全な投与量についての基準としての投与量を提供した。

10

## 【0318】

実験動物を、体重に基づいて4つの群へのランダムに分割した。各群6匹の動物(3匹の雄および3匹の雌)であった。投与した薬物の体積は、1ml/kg体重であった。体重を毎週測定し、投与量を、測定した体重に従って調節した。その薬物を、連続3週間の間、毎日朝に投与した。心電図、血液学的試験、生化学的試験、尿および糞便の試験、ならびに抗体の決定を、薬物投与前、ならびに薬物投与開始の10日間後および21日間後に、それぞれ実行した。底(fundus)実験を、22日目および42日目(薬物投与の第1日目から数えた)にそれぞれ麻酔下で実施し、その後、2/3および1/3の動物を屠殺し、剖検し、そして病理組織学的に研究した。骨髄スミアを同時に調製した。心エコー検査を、剖検の1日前に麻酔下で実施した。

20

## 【0319】

この試験薬物に関連する動物死は、この実験の間に全く生じなかった。嘔吐、悪心および唾液過多が、薬物投与開始の1週間後に、各薬物摂取群において動物の一部で生じた：立毛、艶のない柔皮、活性の減少、食欲不振が、薬物投与の2週間後に観察された。軽度の蒼白、局所的皮膚および脈管の硬化が、薬物注射部位にて発生した。上記の症状および徴候は、退薬の3週間後に消失したかまたは減少した。異常な発現は、薬物投与期間の間および退薬後の回復期間の間には、コントロール群の動物において観察されなかった。

30

## 【0320】

高用量群において、食物摂取は有意に減少し、そして体重は顕著に低下した(薬物投与前および薬物投与後の自己比較は、この差が有意であったことを示した；しかし、コントロールの群の体重と比較した場合、有意な差はなかった)。すべての動物において、薬物投与前および薬物投与後で体温の有意な変化はなかった。

## 【0321】

血液検査、生化学検査、尿素試験および糞便試験は、有意な毒性変化を示さなかった。

## 【0322】

心電図検査：理性のある動物において、10日間の薬物投与で心拍の有意な減速は見られなかったが、すべての薬物を摂取した群の理性のある動物において、3週間の薬物投与で心拍数の有意な減少が起こった。これはおそらく、試験薬物の薬理効果に起因する；さらに、心電図のV1リードにおけるR波およびV3リードにおけるS波の相対的に高い電圧は、おそらく、動物の胸部リードの変動と関連する；病理学的には、心電図、心拍数および他の指標における有意な異常性、ならびに心筋の肥大性の変化は見られなかった。

40

## 【0323】

眼底検査において、異常な変化は見られなかった。

## 【0324】

骨髄塗抹標本において、有意な毒性病理変化は見られなかった。

## 【0325】

50

3週間の薬物投与で実施した検死は、中用量群および高用量群の両方において、それぞれ3頭の動物における心内膜液浸出を示し、これらの各々で2～3mlの漏出液を取り出すことができた；クモ膜下腔における水頭症を、高用量群の2頭の動物において発見し、それらの各々から、それぞれ0.5mlおよび3mlの漏出液を取り出した。

【0326】

心筋の細胞質において出現した種々の程度の空腔、軟膜下の血管の鬱血および軽い水腫が、水頭症を有する場合に見られた。これらのすべては、試験薬物による何らかの影響を有していた。。

【0327】

抗体試験は、ネガティブな結果を示した。

10

【0328】

これらの動物の胃腸の症状（例えば、嘔吐、吐き気および食欲不振）および高用量群において生じる体重の減少は、おそらく、胃腸管における試験薬物の分布および排泄に起因する。症状（例えば、蒼白、注射部位での皮膚の硬化、心内膜液浸出および水頭症）、および退薬の3週間後に高用量群の動物の水頭症の完全な回復なしの症状は、アカゲザルにおける毛細血管の滲出症候群および漏出症候群が、注射用組換えヒトニューレギュリン-1 S177-Q237の中用量および高用量によって引き起こされ得ることを実証した。さらに、理性のある動物における心拍の減速および高用量群に関する心筋の細胞質における空腔は、すべて試験薬物と関連付けられた。

【0329】

20

結論：アカゲザルに対する注射用組換えヒトニューレギュリン-1 S177-Q237の7.5g/日、15g/日、75g/日の毎日の静脈内注射を合計3週間、および連続的なモニタリングを3週間行った。この結果は、10日間を超える注射用組換えヒトニューレギュリン-1 S177-Q237の連続注射が、理性のある動物における心拍の減速を引き起こし得たこと；これは、胃腸反応をもたらし得ること；注射用組換えヒトニューレギュリン-1 S177-Q237の連続注射が、中用量群および高用量群のアカゲザルにおいて軟膜下の心内膜液浸出、水頭症および軽度の鬱血ならびに水腫を引き起こし、水頭症は、高用量群の動物において退薬の3週間後に完全には回復しなかったこと；注射部位における肌および脈管の蒼白および硬化が、退薬後に徐々に回復したことを示した。これらの徴候は、考えられる原因が、毛細管の漏出-滲出症候群であることを実証した。注射用組換えヒトニューレギュリン-1 S177-Q237の高用量は、心筋の細胞質における空腔を引き起こし得た；抗体試験はネガティブな結果を示した。3週間の薬物投与および3週間の回復期間中に、心内膜液浸出および水頭症を引き起こさなかった投薬レベルは、7.5g/kg/日であった。

30

【0330】

(1. 実験の目的)

注射用組換えヒトニューレギュリン-1 S177-Q237の毒性反応およびそれらの生物体に対する重篤度を研究すること、毒性反応の標的器官および損傷の可逆性を調査すること、毒性反応を引き起こさない用量を決定すること、ヒトにおいて使用されるべき安全な用量のための参考としての用量を供給すること。

40

【0331】

(2. 試験薬物)：

2.1 薬物の名称：注射用組換えヒトニューレギュリン-1 S177-Q237

【0332】

2.2 バッチ番号：200210024。

【0333】

2.3 薬物を提供した機関：Zensun (Shanghai) Science & Technology Development Company Ltd, 住所：C棟2階、328 Bi Bo Road, Zhang Jiang High Tech

50

Z o o n。

【0334】

2.4 含有量：3.75 mg / ml。

【0335】

2.5 比活性： $1.12 \times 10^4$  U / mg。

【0336】

2.6 性質：無色透明溶液。

【0337】

2.7 保管：4 で保存。

【0338】

2.8 賦形剤：0.15 M NaCl、10 mM リン酸ナトリウム、pH 6.0

10

【0339】

2.9 調製：標準生理食塩水で必要な濃度まで希釈する。

【0340】

(3. 動物)：

3.1 動物種：アカゲザル。

【0341】

3.2 動物の出所：Da Li Ji アカゲザル飼育場、Li Xing County、Anhui Province、適格性の認可：Wan Fa Xun Fan 第2002-6号。

20

【0342】

3.3 動物の受入日：2002年10月13日。

【0343】

3.4 体重：薬物投与の開始時に2.6 kg ~ 5.9 kg。

【0344】

3.5 性別：オス半数およびメス半数。

【0345】

3.6 動物の数：合計24頭。

【0346】

3.7 動物におけるマーク：胸部カードを使用して、個々の動物を識別した。

30

【0347】

3.8 給餌条件：各々のケージについて1頭の動物に、顆粒飼料(Shanghai Shi Ling Science & Technology Company Ltdによって提供された)を与えた。動物に、約100gの果物に加えて、100gの飼料を1日2回与えた。室温を20 ~ 25 に保ち、相対湿度を50% ~ 70%、毎日12時間の照明を保った。

【0348】

3.9 環境適応時間：環境適応のために25日間の給餌。

【0349】

(4. 投薬)：

4.1 投薬準備：

コントロール群：0 μg / kg / 日(賦形剤と同じ容積を注射した)；

低用量群：7.5 μg / kg / 日(サルの等価用量の2倍に相当する)；

中用量群：15 μg / kg / 日(サルの等価用量の4倍に相当する)；

高用量群：75 μg / kg / 日(サルの等価用量の20倍に相当する)。

【0350】

4.2 投薬準備の理論的根拠：

注射用組換えヒトニューレギュリン-1 S177-Q237 のための表示されていた効能は、心不全の治療についてであった。マウスの薬力学的モデルは、前心臓性コクサ

40

50

ッキーB3ウイルスにより誘導した心筋炎モデルであり、使用された用量は、 $7.5 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ 、 $15 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ 、および $30 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ （サルについて使用される $1.875 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ 、 $3.75 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ 、および $7.5 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ に相当する）であり、連続5日間静脈内に注射し、病理学的スコアは、それぞれ、1.5、0.7、0.56であった（病理学的採点法についての基準は：スコア0：病変の領域 = 0%、スコア1：病変の領域 = 25%、スコア2：病変の領域 = 50%、スコア3：病変の領域 = 100%）。従って、 $15 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ および $30 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ の用量は、心臓に対する損傷を有意に減少し得た。薬物投与の指定経路は、1日1回で連続3～5日間の静脈内注射であった。注射用組換えヒトニューレギュリン-1<sub>S177-Q237</sub>の静脈内注射における急性毒性実験のMTDは、 $35 \text{mg} / \text{kg}$ であった。有意に有効な用量としてサルについての等価用量の $3.75 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ を取ると、動物についての長期毒性用量は、暫定的には、動物の有効用量の2倍、4倍、および20倍に定められる。

10

## 【0351】

(5. 薬物投与のコース) :

1日1回を連続3週間。

## 【0352】

(6. 回復期間) :

3週間。

## 【0353】

(7. 投与した薬物容積) :

 $1.0 \text{ml} / \text{kg}$  体重。

## 【0354】

(8. 薬物投与の経路) :

臨床的に使用される静脈内注射と同様の、ゆっくりした静脈内注射。

## 【0355】

(9. 実験の方法) :

アルベンダゾールを使用して、腸の寄生虫を殺し、そして実験動物を購入する前にツベルクリン試験を実施し、次いで、環境適応試験；血液試験、生化学試験、尿試験および心電図検査を2回実施して、実験動物が健康な状態であることを保証した。動物の体重および性別に基づいて、各々の群に6頭の動物、オス半数およびメス半数を含む、4つの群に分類した。投与した薬物の容積は、 $1.0 \text{ml} / \text{kg}$  体重であり、体重は、各々の薬物投与の前に毎週測定し、そして投与すべき薬物の容積は、測定した体重に従って調整し、各々の群における2/3および1/3の動物（それぞれ2頭のメスザルおよび1頭のオスザル）を、3週間の薬物投与の24時間後に殺し、そして回復期間の3週間後の終わりに、検死を実施し、器官を秤量し、器官係数を計算し、そして病理組織検査を行った。血液を血液検査および生化学検査のために抜き取り、そして骨髓塗抹標本を薬物投与の10日目および検死の前に実施した。

30

## 【0356】

9.1 試薬 :

9.1.1 血液試験のための試薬。

## 【0357】

9.1.2 血清生化学試験のための試薬：微量の輸入生化学試薬。

## 【0358】

9.1.3 抗体検出のための主な試薬。

## 【0359】

1. コーティング液： $100 \text{ml}$  の水中に溶解させた  $\text{NaHCO}_3$   $0.293 \text{g}$ 、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$   $0.159 \text{g}$ 。

## 【0360】

2. 基板緩衝溶液： $\text{pH}$   $5.0$ 、水中に溶解させたクエン酸  $1.02 \text{g}$ 、 $\text{Na}_2$ 

50

$\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  3.68 g。

【0361】

3. 清浄溶液：1：2000 Tween-20を添加した0.01M PBS。

【0362】

4. 封着溶液：100ml中に溶解させた濃縮脱脂粉乳5g、pH7.4 0.01M PBS。

【0363】

5. HRP標識ラット抗サル二次抗体：米国バッチ番号A-2054のSigma社の製品。

【0364】

6. Tween-20：個別包装の輸入原材料、Zensun (Shanghai) Science & Technology Company Ltdによって提供された。

10

【0365】

7. テトラメチロ (tetramethylo) - アミノベンゼン (TMB)：個別包装の輸入原材料、Shanghai Huamei Bioengineering Companyによって提供された。

【0366】

8.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ：分析試薬、Shanghai Ling Feng Chemical Reagent Co Ltd。

20

【0367】

9.2 装置：

Roche 血液検査血球計数器。

【0368】

Hitachi-7060 生化学自動分析機。

【0369】

550酵素標識機：米国のBIO-RADの製品。

【0370】

Heraeus低温遠心分離機、独国のHeraeus社。

【0371】

Hewlett Packard sonos 5500心電図検査機 (S4プローブを使用)。

30

【0372】

9.3 血液試験の方法および血清生化学試験の方法：以下の表を参照のこと  
血液試験の方法

【0373】

【表 3 9】

試験の主題	試験の方法
WBC 白血球	機器分析
RBC 赤血球	機器分析
PLT 血小板	機器分析
Ht ヘマトクリット	機器分析
Hb ヘモグロビン	機器分析
MCV 平均赤血球容積	機器分析
MCH 平均赤血球ヘモグロビン	機器分析
MCHC 平均赤血球ヘモグロビン濃度	機器分析
Ret 網赤血球数	プリリアントクレシルブルー法
DC 分化数	ライト染色
CT 凝固時間	スライド法

10

## 血清生化学試験の方法

【0374】

【表 4 0】

試験	方法
ALT/GPT アラニンアミノトランスフェラーゼ	IFCC w/o P-5-P
AST/GOT アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ	IFCC w/o P-5-P
ALP アルカリホスファターゼ	トリス/炭水化物
LDH 乳酸デヒドロゲナーゼ	L-P 酵素法
CPK クレアチンホスホキナーゼ	NAC 酵素法
BUN 血液尿素窒素	ウレアーゼ-GLDH動力学
CRE クレアチニン	ヤッフエ動力学
GLU グルコース	オキシダーゼ
T-Bil 総ビリルビン	ジメチルスルホキシド法
T-CHO 総コレステロール	酵素学
TP 総タンパク質	ピウレット
ALB アルブミン	ブロムクレゾールグリーン法
K <sup>+</sup> カリウム	電極法
Na <sup>+</sup> ナトリウム	電極法
Cl <sup>-</sup> 塩化物	電極法
P <sup>+++</sup> /PHOS 無機リン	リンモリブデート-UV
Ca <sup>++</sup> カルシウム	オルトクレゾールフタレインコンプレクソン法
Mg <sup>++</sup> マグネシウム	カルマナイト錯指示薬

20

30

40

## 9.4 抗体検出の方法

コーティング抗原：注射用組換えヒトニューレギュリン - 1 S 1 7 7 - Q 2 3 7 を、コーティング緩衝溶液で 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に希釈し、96穴の酵素標識プレート中に 100  $\mu\text{l}$  /穴で添加した、37 1時間。

【0375】

封着：5回プレートを洗浄し、清浄溶液を用いて5%濃縮脱脂粉乳を調製する。

【0376】

試験用指定血清の希釈；サンプル希釈溶液を用いてサンプルを希釈する、希釈勾配は1：100。

【0377】

50

添加サンプル：封着した酵素標識プレートを3回洗浄し、試験用指定血清を添加する、  
100  $\mu$ l / 穴、37 1時間。

【0378】

酵素標識抗体の添加：プレートを5回洗浄し、1：1000希釈したHRP標識ラット  
抗サル免疫グロブリンを添加する、100  $\mu$ l / 穴、37 1時間。

【0379】

基板：プレートを5回洗浄し、新規に調製した基板作動液を添加する、100  $\mu$ l / 穴  
、37 10分間。

【0380】

終結：1穴あたり50  $\mu$ lの2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を添加して、反応を終了する。

10

【0381】

端数検出：ポジティブな結果を、試験サンプルのOD値として規定し、これはネガティブ  
コントロールのOD値よりも2.1倍大きかった(血清は、1：100希釈した)。

【0382】

(10. 観察期間および研究期間)

10.1 死亡状態：

モニタリングを、1日1回または2回行い、そして任意の動物の死亡があった場合に、  
動物の死亡時間を記録する。

【0383】

10.2 全体的な症状：

全体的な外観、兆候、行動活動、ケージ表面に付着した血液または滲出液、毛皮の艶が  
挙げられる。観察は、1日1回または2回行った。

20

【0384】

10.3 体重：

体重を、1日1回薬物投与の前に測定した。

【0385】

10.4 体温：

体温を、薬物投与の1日目、3日目および5日目に、薬物投与の前および薬物投与の1  
時間後に計った。

【0386】

10.5 飼料摂取：

100gの果物と共に、顆粒飼料200gを毎日各々のサルに与え、1日当たりの動物  
1頭当たりの食物の消費を算出する。

30

【0387】

10.6 心電計：

薬物投与の前、および、また薬物投与開始10日後、薬物投与終了時ならびに回復期間  
の間に、2回の心電計検査を行い、それぞれP-R値、QRS値、QT値およびST値を  
、計算した。

【0388】

10.7 エコー心臓検査器：

薬物投与の終了後および回復期間の最後かつ死体解剖の1日前に、死体解剖する計画の  
動物を3%ペントバルビタール(30mg/kg)の静脈注射で麻酔し、次いで、エコー  
心臓検査を行って、心室内厚(IVS)、左心室後壁(PW)、左心室拡張終期容量(L  
VDd)、左心室収縮末期容量(LVDs)、駆出画分(EF)、短縮画分(short  
ening fraction)(Fs)、僧帽弁血流ピーク値(MV)、大動脈弁血流  
ピーク値(AV)および心拍(HR)を決定する。

40

【0389】

10.8 血液学指数：

薬物投与前、薬物投与開始10日後、薬物投与終了時、および3週間の回復期間の最後  
(死体解剖前)、0.5mlの血液を、伏在静脈から2回採血し、これを、抗凝血のため

50

に 3.8% EDTA で処理し、以下の指数について検査した：赤血球数 (RBC)、網赤血球数 (Ret)、ヘモグロビン (Hb)、白血球数 (WBC)、ならびに以下：好中球 (N)、好酸球 (E)、リンパ球 (L) および単球 (M)、を含む分化項目、血小板数 (PLT)、凝固時間 (CT)、ヘマトクリット (Ht)、平均血球容積 (MCV)、平均ヘモグロビン濃度 (MCH)、および平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC)。

【0390】

10.9 血清生化学指数：

薬物投与前、薬物投与開始 10 日後、薬物投与終了時、および 3 週間の回復期間の最後 (死体解剖前)、5 ml の血液を、伏在静脈から 2 回採血し、遠心分離後血清を分離し、そして以下の項目を試験した：アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルカリホスファターゼ (ALP)、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH)、クレアチンホスホキナーゼ (CPK)、血中尿素窒素 (BUN)、総タンパク質 (TP)、アルブミン (ALB)、グルコース (GLU)、血清総ビリルビン (T-Bil)、クレアチニン (CRE)、総コレステロール (T-CHO)、ナトリウム ( $\text{Na}^+$ )、カリウム ( $\text{K}^+$ )、塩素 ( $\text{Cl}^-$ )、カルシウム ( $\text{Ca}^{++}$ )、マグネシウム ( $\text{Mg}^{++}$ )、およびリン ( $\text{P}^{+++}$ )。

10

【0391】

10.9 尿検査：

薬物投与前、薬物投与開始 10 日後、薬物投与終了時、および 3 週間の回復期間の最後 (死体解剖前)、尿サンプルを収集し、白血球数、亜硝酸塩、pH 値、尿タンパク、グルコース、ケトン体、ウロビリノゲン、尿ビリルビンおよびヘモグロビンについて試験した。

20

【0392】

10.11 糞便検査：

糞便寄生虫卵および潜血を、薬物投与前に試験した。また、糞便潜血試験を、薬物投与開始 10 日後、薬物投与終了時、および 3 週間の回復期間の最後にも行った。

【0393】

10.12 眼底検査：

眼底検査を、死体解剖前に、麻酔下で行った。

【0394】

10.13 全身的死体解剖：

各群における 2/3 および 1/3 の動物 (各 2 匹の雌および 1 匹の雄) を、薬物投与 3 週間後の 24 時間および薬物投与終了後の回復期間の最後に屠殺し、死体解剖を行った。

30

【0395】

10.14 器官係数：

心臓、脳、肝臓、脾臓、肺、腎臓、副腎、胸腺、リンパ節、甲状腺、精巣もしくは子宮、卵巣または前立腺を採取し、その重量を測定し、そして係数を計算した。

【0396】

10.15 病理組織学検査：

以下の器官の病理組織学試験を行った：心臓 (左心室の前壁、右心室、横隔膜、左心房、右心房)、肝臓、脾臓、肺、脳、胃、十二指腸、回腸、結腸、腎臓、膀胱、副腎、下垂体、甲状腺、胸腺、膵臓、精巣、前立腺、卵巣、子宮、リンパ節 (頸部、腸間膜)、血管および注射した部位の皮下組織。

40

【0397】

10.16 骨髓検査：

大腿骨からの骨髓サンプルを、死体解剖前に麻酔下で採取し、塗抹標本を作製し、染色し、光学顕微鏡検査を行って、巨核球 (megakaryocyte) 系、顆粒球および赤血球系、リンパ球、形質細胞、および他の型の細胞を調べた。4 つの四分区間および中央部において  $5 \times 100$  個の有核細胞を計数し、GE 比を計算し、写真撮影した。

【0398】

50

10.17 注射抗体検出のための血清組換えヒトニューレギュリン - 1<sub>S177-Q237</sub> :

薬物投与開始1週間後、2週間後および3週間後、ならびに回復期間の最後に、注射抗体のための血清組換えヒトニューレギュリン - 1<sub>S177-Q237</sub>を検出し、そして抗体を検出し、検出した抗体が中和抗体であった場合にいつでも薬物投与を停止した。

【0399】

10.18 データ処理および統計分析 :

種々の用量群およびコントロール群から収集したデータについての統計学的検定として、分散分析を行った。

【0400】

(11. 実験の結果 : )

11.1 死亡状態 :

実験期間中、試験薬物に関連する動物死は起こらなかった。3週間の薬物投与の最後に、コントロール群および低用量群(5番および6番)の各1匹の動物の心拍の有意な減速(20~30拍/分)が、3週間の回復期間の最後に麻酔下のエコー心臓検査を通して見られた;これは、過剰麻酔の徴候であり、従って、死体解剖を計画したより1日早く行った。

【0401】

11.2 一般的徴候 :

薬物投与の2日目に、静脈注射の30分後、高用量群の1匹の雄サルにおいて嘔吐が起こった。薬物投与の2日目~7日目の間、中用量群および高用量群における各1匹の動物が、静脈注射の20~30分後に嘔吐した。投与一週間後に全ての群の一部の動物に流涎が起こり、その出現頻度は、高用量群において、他の薬物摂取群よりも有意に高かった;低用量群中1匹の動物だけが、薬物投与の9日目に流涎を示した。薬物投与の2週間後、高用量群において、起毛、毛皮のつやの消失、活動性の低下、食欲不振が現れた。軽度の蒼白、注射部位の局所的皮膚および血管の硬化が、薬物投与の3日目から始まり、これは進行的に亢進し、そして用量依存的であった。上述の症状および徴候は、薬物中止後の3週間の回復期間に消失するかまたは改善された。不規則な淡黄色の下痢便が、高用量群の21番の動物において起こった。コントロール群の動物において、薬物投与の間および薬物中止後の回復期間の間、異常な徴候は現れなかった。

【0402】

11.3 体重変化 :

コントロール群の動物と種々の薬物摂取群の動物との間で、有意の体重の相違は見られなかった( $P > 0.05$ );動物における薬物投与前および後の自己比較は、高用量群の動物において、有意な体重減少を示した( $P < 0.01$ )。

【0403】

11.4 体温 :

薬物投与の1日目、3日目、および5日目において、薬物投与前および薬物投与1時間後に測定した体温に、有意な相違は見られなかった。

【0404】

11.5 飼料摂取 :

中用量群および高用量群の動物において、薬物投与1週間後、飼料の有意な残留、および飼料の50g~150gの種々の摂取量が見られた。コントロール群および低用量群の動物において、飼料の残留は見られず、そして回復期間の全ての動物において飼料の残留は起こらなかった。

【0405】

11.6 心電計検査の結果 :

薬物投与の10日目に、全ての薬物摂取群の意識のある全ての動物において、有意の心拍の減速は見られず(コントロール群の心拍と比較したとき $P > 0.05$ )、そして全ての薬物摂取群の意識のある動物において、有意の心拍の減速が起こった(コントロール群

10

20

30

40

50

の心拍と比較したとき  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ ) ; 同時に、P - R、QRS および Q T の間隔を、低用量群および中用量群においてより顕著にするために延長したところ、薬物中止 3 週間後、正常に戻った。中用量群および高用量群の動物における R v 1 の電圧はより高く、一方、高用量群、低用量群および中用量群における S v 1 はより深く、各薬物摂取群における R v 3 の電圧は、より高かった ( $P < 0.05$  ;  $P < 0.01$  および  $P < 0.001$ )。異なった時間に収集した他の独立したパラメータにおいて軽度のゆらぎがあったが、全て正常範囲内であった。

#### 【0406】

##### 11.7 エコー心臓検査の結果：

薬物投与 3 週間目および 3 週間の回復期間の最後に、コントロール群および種々の薬物摂取群において、エコー心臓検査のパラメータにおいて、有意の相違は見られなかった ( $P < 0.05$ )。 10

#### 【0407】

##### 11.8 血液学的検査の結果：

全実験期間の間、独立したパラメータの正常範囲内のゆらぎに加えて、有意な異常変化は見られなかった。

#### 【0408】

##### 11.9 血清生化学検査の結果：

全実験期間の間、独立したパラメータの正常範囲内のゆらぎに加えて、有意な異常変化は見られなかった。 20

#### 【0409】

##### 11.10 尿検査の結果：

全ての薬物摂取群およびコントロール群における動物個体の尿検査において、尿タンパクの増加、陽性ケトン体 (しかし、不規則である) が、薬物投与前、薬物投与開始 10 日後および薬物投与開始 3 週間後、3 週間の回復期間 (死体解剖前) に見られた。コントロール群および全ての薬物摂取群の動物個体において、尿中の赤血球の過渡的な増加が見られた。他の有意な異常は見られなかった。

#### 【0410】

##### 11.11 糞便検査の結果：

薬物投与前、薬物投与開始 10 日後、薬物投与開始 3 週間後、および 3 週間の回復期間 (死体解剖前) に、全ての動物において、糞便潜血検査陰性が見られ、糞便寄生虫卵は見られなかった。 30

#### 【0411】

##### 11.12 眼底検査の結果：

薬物投与 3 週間目および 3 週間の回復期間 (死体解剖前) に行った眼底検査において、異常は見られなかった。

#### 【0412】

##### 11.13 全身性死体解剖：

中用量群中の 2 番雄サルならびに 2 3 番および 2 4 番の雌サルにおいて、心臓における少量の浸出を発見し、薬物投与 3 週間目に、各動物から明淡黄色の液体を 2 ~ 3 ml 採取した ; くも膜下領域における水頭 (hydrocephalus) が、高用量群の 1 番および 2 1 番の動物において見られ、各動物から明淡黄色の液体を 1 ~ 2 ml 採取した ; 2 1 番動物において、心臓における少量の浸出、結腸粘膜の表面上に出血箇所があり、これは、潰瘍の病巣を有する 2 1 番動物と一緒にあった。高用量群の 2 2 番雄サルにおいて、肺葉における鬱血および出血性病変が見られた。コントロール群の 8 番サルは、過剰麻酔のために死体解剖前に死亡し、死体解剖の間、肺に有意な鬱血およびまだら状の出血が見られたが、他の有意な異常は見られなかった。 40

#### 【0413】

3 週間の回復期間の最後に、くも膜下領域における水頭が、高用量群の 1 匹の雄の動物および 1 匹の雌の動物 (10 番 ; 14 番) において見られ、これらからそれぞれ液体を 0 50

．5 ml および 3 ml 採取した；過剰麻酔し早めに死体解剖した動物において、有意の異常は見られなかった。

【0414】

他の器官において、異常は見られなかった。

【0415】

上述の滲出液についての検査の結果は、これらが全て漏出液であることを実証した。

【0416】

11.14 器官の重さおよびこれらの係数

主要器官の重さを測定し、そして死体解剖の間、全ての動物の器官係数を計算した。試験薬物と何かするような器官重量に異常な変化は、見られなかった。

10

【0417】

11.15 病理組織学検査の結果：

淡く染まった液胞が、「+」または「+~++」の重篤度を有する高用量群の1番、11番の雄サルおよび21番雌サルにおいて、心房および心室の心筋の細胞質中に現れ、筋状構造は維持された；心内膜および心膜の有意の異常のない、拡散小胞様変性があった。他方、血管鬱血および中程度の水腫が、11番および21番のサルにおいて、くも膜下(subarachnoid)領域において見られた；死体解剖前に死んだ8番動物の死体解剖の間、21番動物の結腸粘膜の一部に、炎症細胞浸潤があった；肺胞(avleola)中隔、鬱血、肺のまだら状出血、肺胞(avleola)の一部における浮腫液の充満、腎臓、胃、結腸、腸および膵臓における部分的組織自己細胞溶解が見られた。他の異常は見られなかった。

20

【0418】

高用量群の14番雌サルにおいて、心筋細胞質内の微小液胞、くも膜下領域における血管収縮が見られた。過剰麻酔によって早めに死体解剖した動物において、有意な異常は、発見されなかった。全ての薬物投与群において、注射部位内の血管における出血性変化に加えて、刺激に対する有意な応答は見られなかった。散発性の偶然の病変(例えば、肺および胃腸管における炎症反応)は、残りの動物において見られたが、それらのほとんどは自然発生の病変であった。

【0419】

(11.16 骨髄試験の結果)

3週間の薬物投与および回復期の第3週目における麻酔下での剖検の前に、骨髄を右寛骨から吸引し、塗抹作製、染色し、巨核球系、顆粒球系、赤血球系、リンパ球およびプラズマ細胞ならびに他の型の細胞を、光学顕微鏡下で試験した。四分円および中央部分の5×100の有核細胞を計数し、分化の計数を行い、GE比を計算し、顕微鏡写真術を実施した。

30

【0420】

結果：顆粒球系、赤血球系および巨核球系全てにおいて、赤血球系に対する顆粒球の正常な比で、正常な増殖が観察された。異常な病的な細胞および骨髄毒性による病的な障害は起こらなかった。

【0421】

(11.17 注入抗体検出についての血清組換えヒトニューレギュリン-1<sub>S177</sub>-Q<sub>237</sub>の結果)

全ての薬物摂取群における注射抗体検出についての全ての血清組換えヒトニューレギュリン-1<sub>S177</sub>-Q<sub>237</sub>は、薬物投与の開始の1、2、3週間後および回復期の3週目の終わりでは、ネガティブな結果を示した。

40

【0422】

(12.考察)

アカゲザルへの注射のための7.5、15、75 g/dの組換えヒトニューレギュリン-1<sub>S177</sub>-Q<sub>237</sub>の静脈内注射(使用した用量は、サルに対する用量の2、4、20倍と等量であった)；賦形剤をコントロールとして使用した；薬物中止の後3週間、

50

モニタリングを実施した。

【0423】

実験の間、試験薬物と関連した動物死は生じなかった。薬物投与の開始の1週間後に各薬物試験群の動物の一部で、嘔吐、吐き気および唾液分泌が生じた；薬物投与の2週間後、高用量群の動物で、毛髪直立、つやのない毛皮、活性の低下、摂食障害が観察された；軽い蒼白、薬物注射の部位の局所的な皮膚および血管の硬化；前に述べた症状および徴候は、薬物中止の3週間後で消えたかまたは低減した。薬物投与の期間および薬物中止後の回復期の間、コントロール群の動物では、異常な徴候は、観察されなかった。

【0424】

薬物投与の前後で自己と比較して、高用量群では、食物摂取は有意に低減し、体重は顕著に低くなった。薬物投与の前後で、全ての動物の体温の顕著な変化はなかった。

【0425】

血液学的な試験、生化学試験ならびに尿および糞便の試験は、顕著な毒性変化を示さなかった。

【0426】

心電図検査：10日間の薬物投与において、意識のある動物では、心拍数の有意な減少は観察されなかったのに対して、毎日の薬物摂取群の意識のある動物での3週の薬物投与で、心拍数の有意な減少が生じたが、これはおそらく試験薬物の薬理学的な効果のためであり；さらに、心エコー図のV1およびV3誘導における比較的高い電圧のR波およびS波は、おそらく動物の胸部誘導の変化と関連する。心エコー図、心拍数および他の指標において有意な異常は検出されず；心筋の肥大性変化は、病理学的には観察されなかった。

【0427】

基底膜試験における異常な変化は観察されなかった。

【0428】

骨髄の塗抹標本では、有意な毒性病理学的な変化は、観察されなかった。

【0429】

薬物投与の3週間で行なった剖検は、3匹の動物で（両方の培地のそれぞれおよび高用量群で）心外膜液を示し、2～3mlの濾出液を取り除き得；高投薬群の2匹の動物で、クモ膜下腔において水頭を発見し、1～3mlの濾出液を取り除いた。

【0430】

心筋の細胞質、血管うっ血および軟膜下の軽い水腫で見られる種々の程度の小胞は、水頭で観察された。これら全ては、試験薬物となんらかの関係を有した。

【0431】

抗体試験は、ネガティブな結果を示した。

【0432】

胃腸の症状（例えば、それらの動物の嘔吐、吐き気および摂食障害）はさらに、おそらく、胃腸管での試験薬物の分布および排出のために、高用量群での体重の減少につながり得た。症状（例えば、蒼白、注射部位での皮膚の硬化、心外膜液および水頭症が観察され、薬物中止3週間後の高投薬群動物では、水頭症の完全な回復はなく、中用量および高用量の組換えヒトニューレギュリン-1<sub>S177-Q237</sub>の注射群で、アカゲザルにおいて毛細血管浸出物および漏出液症候群が起こり得ることを示した。さらに、意識のある動物における心拍数の減速および高用量群動物の心筋の細胞質中の小胞は、全て試験薬物と関連していた。

【0433】

結論：合計3週間のアカゲザルへの注射のための7.5、15、75g/dの組換えヒトニューレギュリン-1<sub>S177-Q237</sub>の毎日の静脈内注射および3週間の継続的なモニタリングを実施した。結果は、注射のための組換えヒトニューレギュリン-1<sub>S177-Q237</sub>の10日間より長い継続的な注射が、意識のある動物において心拍数の減速を引き起こし得ることを示した；それは、中用量群および高用量群のアカゲザルで、胃腸の反応につながり得、心外膜液を引き起こし、水頭症および軽いうっ血および軟膜下

での水腫を引き起こし、水頭症は、高用量群の動物では、薬物中止の3週間後では完全には回復せず；注射した部位の皮膚および血管の蒼白および硬化は、薬物の中止後、次第に回復した。これらの徴候は、毛細血管濾出液浸出症候群が潜在的な原因であることを示した。高用量の組換えヒトニューレギュリン-1<sub>S177-Q237</sub>の注射は、心筋の細胞質に小胞を生じ得；全ての抗体試験がネガティブな結果を示した。3週間の薬物投与および3週間の回復期の間、心外膜液および水頭症を引き起こさなかった用量レベルは、7.5 g / kg / dであった。

#### 【0434】

(実施例8. NGR-1活性のインビトロでの決定(キナーゼレセプター活性化のためのELISA試験)

10

##### (1. 実験の原理)

HER2/neu遺伝子は、膜貫通タンパク質p185をコードし、これはチロシンプロテインキナーゼである。ニューレギュリン-1のErbB3またはErbB4との結合は、ヘテロ二量体ErbB3-ErbB2およびErbB4-ErbB2形成を誘導し、HER2によりコードされるチロシンプロテインキナーゼ(ニューレギュリン-1の機能性シグナルの伝達を仲介する)を活性化する。ニューレギュリン-1のそのレセプターとの結合がErbB2タンパク質のリン酸化を引き起こすという事実に基いて、本発明者らは、組換えニューレギュリン-1の生物学的活性をインビトロで定量的に決定するための、迅速で、感度が良く、高流量の方法を確立する。

#### 【0435】

20

##### (2. 実験材料)

2.1 96穴細胞培養プレート(Corning社); Costar 96穴ELISA検出プレート

2.2 U.S.A.TCCから導入したヒト乳癌細胞株を、37°Cで、50% CO<sub>2</sub>下で、基本培養培地で培養した。

#### 【0436】

2.3 所定量のDMEMを秤量し、対応する体積を定量し、3.7 g / LのNaHCO<sub>2</sub>、0.1 g / L グルタミンおよび5.5 g / LのHEPESを添加した。

#### 【0437】

##### 2.4 基本培養培地

10% ウシ胎仔血清およびインスリン9 mg / Lを含むDMEM培地を4°Cで保存した。

30

#### 【0438】

2.5 PBS(0.01 M、pH 7.4)を滅菌した。

#### 【0439】

##### 2.6 0.5% 胰臓酵素

Ca<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>を含まないPBSで調製した。

#### 【0440】

2.7 抗ErbB2モノクローナル抗体コーティング緩衝溶液、ローション。

#### 【0441】

ErbB3およびErbB4と交差反応しないマウス抗ヒトErbB2細胞外機能性ドメインH4モノクローナル抗体を選択する。

40

#### 【0442】

コーティング緩衝溶液；pH 9.6、0.05 M 炭酸塩緩衝溶液。

#### 【0443】

ローション：0.01 M PBS + 0.05% Tween-20。

#### 【0444】

2.8 西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識したマウス抗ヒトリン酸化プロテアーゼモノクローナル抗体(抗P-tyr-HRP)

2.9 基質、基質緩衝溶液

50

基質 ( T M B ) : 2 m g / m l T M B ( 無水アルコールで調製 )

基質緩衝液 : 0 . 2 M クエン酸 + 0 . 1 M  $Na_2 H P O_4$  ( p H 5 . 0 ) 。

【 0 4 4 5 】

作業基質 : 基質緩衝溶液 9 m l + T M B 1 m l + 3 %  $H_2 O_2$  1 0  $\mu$  l ( 必要な場合調製 ) 。

【 0 4 4 6 】

2 . 1 0 停止薬剤 : 2 N  $H_2 S O_4$  。

【 0 4 4 7 】

2 . 1 1 細胞脱フラグメント化 ( c e l l d e f r a g m e n t a t i o n ) 溶液  
1 5 0 m M  $NaCl$  + 5 0 m M H e p e s + 1 % T r i t o n - X 1 0 0 + 2 1 0  
m M ( オルトバナジン酸ナトリウム ) + 0 . 0 1 % ( チメロサル ( t h i m e r o s o l ) ) 。

一錠の混合プロテアーゼインヒビター ( 錠剤、プロテアーゼインヒビターの反応混液 ( T a b l e t t e n , P r o t e a s e n - I n h i b i t o r e n - C o c k t a i l ) ) を、作業の前に各 2 5 m l に添加する。

【 0 4 4 8 】

2 . 1 2 標準物質および試験を求められる試料。

【 0 4 4 9 】

( 3 . 実験手順 )

プロセス 3 . 1 を、第 1 日目に実施し、第 2 日目にプロセス 3 . 2 ~ 3 . 3 を実施し、第 3 日目にプロセス 3 . 4 ~ 3 . 1 2 を実施した ; ここで、3 . 1 および 3 . 2 のプロセスは、滅菌条件下で実施すべきである。

【 0 4 5 0 】

3 . 1 細胞の接種

M C F - 7 細胞を所定量まで増殖させ、滅菌 P B S 溶液で洗浄し、次いで 0 . 2 5 % トリプシナーゼで消化した。計数後、細胞の濃度を基本培養培地で調節した。細胞を 9 6 穴細胞培養プレート (  $5 \times 1 0^4$  / 穴、1 0 0  $\mu$  l / 穴 ) に添加し、3 7 °C で 5 %  $CO_2$  下で培養箱中で一晚培養した。

【 0 4 5 1 】

3 . 2 細胞飢餓

9 6 穴プレート中の全ての培養培地を吸引し、各穴を 3 7 °C に加温した P B S で洗浄し、次いで 1 0 0  $\mu$  l の D M E M 培養培地 ( ウシ血清を含まず、インシュリンを含まない ) を添加した。細胞を、3 7 °C で 5 %  $CO_2$  下で培養箱中で 2 4 時間培養した。

【 0 4 5 2 】

3 . 3 コーティング

抗 E r b B 2 細胞外機能性ドメイン H 4 抗体を、コーティング緩衝溶液で 6  $\mu$  g / m l になるまで希釈し、次いで、穴あたり 5 0  $\mu$  l を 9 6 穴 E L I S A プレートに添加し、4 °C 下で一晚 ( 1 6 ~ 1 8 時間 ) 置く。

【 0 4 5 3 】

3 . 4 希釈コントロール溶液および試験を求められるサンプル溶液

コントロール溶液および試験を求められるサンプルを、D M E M 培養培地 ( ウシ血清を含まず、インシュリンを含まない ) でそれぞれ 2  $\mu$  g / m l まで希釈し、次いで 3 倍の勾配希釈を再度行い、全部で 9 希釈を有する。

【 0 4 5 4 】

3 . 5 細胞のリン酸化

飢餓後 9 6 穴細胞培養培地を吸引し、標準物質および試験を求められるサンプルを、穴あたり 1 0 0  $\mu$  l 添加し、各濃度 2 連の穴を準備する。同時にネガティブコントロール ( すなわち、D M E M 培養培地 プラセボコントロール ) を準備する。3 7 °C 下で 2 0 分間反応させた。

【 0 4 5 5 】

3 . 6 細胞の分解

サンプルを迅速に吸引し、PBSで一回洗浄し、100  $\mu$ lの断片化溶液を各穴に添加し、4℃の冷蔵庫で30分間断片化した。足場性依存性細胞が全て落ちるまで、氷浴条件下で水平に攪拌し、4℃で15,000 rpmで15分間遠心する。

【0456】

3.7 ELISA検出プレートの密閉

プレートを5分間洗浄する。5%脱脂粉乳を洗浄溶液で調製し、プレートの各穴に200  $\mu$ l添加し、37℃下に2時間置く。

【0457】

3.8 サンプル添加

密閉ELISAプレートを3回洗浄した後、標準細胞断片化溶液および試験サンプル断片化溶液を穴あたり90  $\mu$ l添加し、同時にネガティブコントロールを準備し、37℃下に1時間置く。 10

【0458】

3.9 酵素標識抗体の添加

プレートを5回洗浄し、HRP酵素結合マウス抗リン酸化チロシンタンパク質抗体を1:5000ローション(手引書を使用して産物および使用する時間によって決定した)で希釈し、プレートの各穴に100  $\mu$ l添加する。37℃下に1時間置く。

【0459】

3.10 基質の発色

プレートを5回洗浄し、調製した基質作業溶液を穴あたり100  $\mu$ lで添加し、37℃下に10分間置いた。 20

【0460】

3.11 停止

反応を停止するために、2N  $H_2SO_4$ を穴あたり50  $\mu$ lで添加した。

【0461】

3.12 OD値の読み取り

ELISA読み取り装置による比色分析は、450 nmの波長、655の参照波長で決定する。結果を記録する。

【0462】

(4. 計算)

組換えヒトニューレギュリン-1の濃度対OD値を用いた作図および分析を、線形回帰方法を使用して行い、試験を求められる各サンプルの半有効量を計算した。 30

【0463】

(5. 必要な試薬処方箋)

1. DMEM基本培養培地

ウシ胎仔血清 100 ml

インシュリン 9.2 mg

を1LのDMEM培養培地に添加し、よく混合する。

【0464】

2. 細胞断片化溶液

NaCl 4.38 g

HEPES 5.96 g

オルトバナジン酸ナトリウム 0.368 g

チメロサル(thimerosal) 0.05 g

Triton-X 100 5 mL

500 mLの $H_2O$ に溶解する。

【0465】

3. コーティング溶液(pH 9.6)

$NaHCO_3$  0.293 g

$Na_2CO_3$  0.159 g

1000 mL の H<sub>2</sub>O に溶解する。

【0466】

4. 1000 mL 基質緩衝溶液 (pH 5.0)

クエン酸 1.02 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 3.68 g

H<sub>2</sub>O に溶解する。

【0467】

5. 密閉溶液 (5% 脱脂粉乳)

脱脂粉乳粉末 5 g

1000 mL の 0.01 M PBS (pH 7.4) に溶解する。

10

【0468】

6. 0.01 M PBS (pH 7.4)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 2.9014 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.2964 g

NaCl 8.5 g

1000 mL の H<sub>2</sub>O に溶解する。

【0469】

7. 0.01 M PBS - T (pH 7.4)

1 mL の Tween 20 を、2000 mL の 0.01 M PBS 中に添加し、よく混合する。

20

【0470】

8. 2 mg / mL TMB

TMB 20 mg

10 mL の無水アルコールに溶解する。

9. 20 × PBS (1000 mL)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 58 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 5.9 g

NaCl 170 g

1000 mL の H<sub>2</sub>O に溶解する。

【0471】

上記実施例は、単に例示目的のために含まれ、本発明の範囲を制限することを意図しない。上記の実施例に対して多くの変化が可能である。上記の実施例に対する改変および変化は、当業者には明らかであるので、本発明は、添付した特許請求の範囲の範囲によってのみ制限されることが意図される。

30

【図面の簡単な説明】

【0472】

【図1】図1は、ニューレギュリタンパク質を組換え産生するために操作された細菌株の構築を示す。

【図2】図2は、ヒトニューレギュリン遺伝子のPCR増幅を示す。レーン1：RT-PCRによって得られる183 bpのニューレギュリン遺伝子；ならびにレーン2および3：DNAマーカー。

40

【図3】図3は、プラスミドPET22bの物理的地図を示す。

【図4】図4は、エンドヌクラーゼ消化による組換えプラスミドの同定を示す。レーン1および3：DNAマーカー；ならびにレーン2：酵素消化後のフラグメント。

【図5】図5は、操作された株の発現についてのスクリーニングを示す。レーン1：マーカー；レーン2：誘導なしで操作された株；レーン3：誘導後1時間；レーン4：誘導後2時間；レーン5：誘導後3時間；レーン6：誘導後4時間；およびレーン7～9：誘導された異なる株。

【図6】図6は、擬操作群のラット(1)における心筋組織の病理学的切片を示す(10 × 10)、特定の病理学的変化が存在しなかったことを示す。

50

【図 7】図 7 は、モデル群における、赤色に染色された領域の大きい面積を示す (10 × 10)。

【図 8】図 8 は、rhNRG-1 群 (20 μg/kg) (I) の、赤色に染色された心筋細胞の散在性の分布を示す (10 × 10)。

【図 9】図 9 は、中間の用量 (10 μg/kg) の rhNRG-1 群 (I) の、赤色に染色された心筋細胞および結合組織の、斑状の分布を示す (10 × 10)。

【図 10】図 10 は、低い用量 (5 μg/kg) の rhNRG-1 群 (I) の、赤色に染色された心筋細胞および結合組織の、斑状の分布を示す (10 × 10)。

【図 11】図 11 は、擬操作群 (II) における心筋組織の病理組織学的切片を示す (10 × 10)、心筋組織の特定の病理学的変化が存在しなかったことを示す。

【図 12】図 12 は、モデル群 (II) において、赤色に染色された領域の大きい面積が見られたことを示す (10 × 10)。

【図 13】図 13 は、高い用量の rhNRG-1 (20 μg/kg) の群 (II) において見られる、赤色に染色された心筋細胞の散在性の分布を示す (10 × 10)。

【図 14】図 14 は、中間の投薬レベルの rhNRG-1 S177-Q237 (10 μg/kg) の群 (II) において見られる、赤色に染色された心筋細胞および線維組織の、斑状の分布を示す (10 × 10)。

【図 15】図 15 は、低い投薬レベルの rhNRG-1 S177-Q237 (5 μg/kg) の群 (II) において見られる、赤色に染色された心筋細胞および線維組織の、斑状の分布を示す (10 × 10)。

【図 16】図 16 は、モデル動物 (I) (HE 染色、50 倍) の心筋線維症領域の毛細管再生に対する rhNRG-1 の影響を示す；A：擬操作群：線維症の変化を有する正常な心筋構造；B：モデル動物群：顕著な心筋線維症および少量の毛細管増殖が見られた；C：20 μg/kg rhNRG-1 群：心筋における斑状の線維症の変化、有意な毛細管増殖；D：10 μg/kg rhNRG-1 群：比較的多数の毛細管増殖を伴う顕著な線維症の変化；ならびに E：5 μg/kg rhNRG-1 群：斑状の線維症の変化および毛細管増殖が見られ得た。

【図 17】図 17 は、モデル動物 (II) (HE 染色、50 倍) の心筋線維症領域の毛細管増殖に対する rhNRG-1 の影響を示す；A：擬操作群：線維症の変化を有する正常な心筋構造；B：モデル動物群：顕著な心筋線維症の変化、少数の毛細管増殖が見られ得た；C：20 μg/kg rhNRG-1 群：心筋における斑状の線維症の変化、有意な毛細管増殖；D：10 μg/kg rhNRG-1 群：顕著な線維症の変化、比較的多数の毛細管増殖が存在した；ならびに E：5 μg/kg rhNRG-1 群：斑状の線維症の変化、毛細管増殖が見られ得た。

【図 18】図 18 は、アドリアマイシンによって誘導される SD ラット毒性心筋炎の、心筋の病理学的切片を示す；a：正常なコントロール群：心筋層の病理スコアは 0 であった。心筋細胞の萎縮症および肥大が存在せず、小胞の形成を伴い、交差した線状が明らかに見られ得る；心筋層が規則的に配置される；心内膜および心膜の異常性なし；脈管および結合組織の変化なし；b：モデル動物群：心筋層の病理スコアは 3 であった。大きい面積の心筋細胞の壊死および溶解。

【図 19】図 19 は、モデル動物の生存率に対する rhNRG-1 の効果を示す。

【図 20】図 20 は、モデル動物の心筋層の構造に対する rhNRG-1 の効果を示す。

【図 21】図 21 は、ウイルスによって感染されたマウス (I) における心筋層の病理的損傷に対する、rhNRG-1 S177-Q237 の効果を示す；A：正常群；B：モデル群；C：プラシーボコントロール群；D：高投薬レベル群；E：中程度投薬レベル群；および F：低投薬レベル群。

【図 22】図 22 は、ウイルスによって感染されたマウスにおける心筋層の病理的損傷に対する、rhNRG-1 S177-Q237 の効果を示す；A：正常群；B：モデル群；C：プラシーボコントロール群；D：高投薬レベル群；E：中程度投薬レベル群；お

10

20

30

40

50

よび F : 低投薬レベル群。

【図 2 3】図 2 3 は、ウイルスによって感染されたマウス ( I ) における心筋層の病理的变化に対する、異なる日数にわたって投与された r h N R G - 1 S 1 7 7 - Q 2 3 7 の効果を示す ( H E 染色、 4 0 倍 ) ; A : 正常コントロール群 ; B : モデル群 ; C : 3 日間 r h N R G - 1 S 1 7 7 - Q 2 3 7 の群 ; D : 5 日間 r h N R G - 1 S 1 7 7 - Q 2 3 7 の群 ; E : 7 日間 r h N R G - 1 S 1 7 7 - Q 2 3 7 の群。

【図 2 4】図 2 4 は、ウイルスによって感染されたマウス ( I I ) における心筋層の病理的变化に対する、異なる日数にわたって投与された r h N R G - 1 の効果を示す ( H E 染色、 4 0 倍 ) ; A : 正常コントロール群 ; B : モデル群 ; C : 3 日間 r h N R G - 1 S 1 7 7 - Q 2 3 7 の群 ; D : 5 日間 r h N R G - 1 の群 ; E : 7 日間 r h N R G - 1 S 1 7 7 - Q 2 3 7 の群。

10

【配列表】

dosage doc 20030516

SEQUENCE LISTING

<110> Zensun(Shanghai)Sci. & Tech. Ltd

<120> NEUREGULIN BASED METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING CARDIOVASCULAR DISEASES

<130>

<140>

<141> 2003 5 15

<150>

<151>

<160> 2

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 183

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

agccatcttg taatattgga ggagaaggag aaacattct gtgtgaatga aggggagtc 60

ttcatggaga aagaccttc aaacctctg agatactgt gcaagtgcc aatgagttt 120

actgggatc gctgccaaa ctactaatg gcagcttct ucaaggcga ggagetgtac 180

cag

<210> 2

<211> 61

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val

1 5 10 15

Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser

20 25 30

Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys

35 40 45

Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln

50 55 60

20

30



【 図 1 0 】



Fig. 10

【 図 1 2 】



Fig. 12

【 図 1 1 】



Fig. 11

【 図 1 3 】

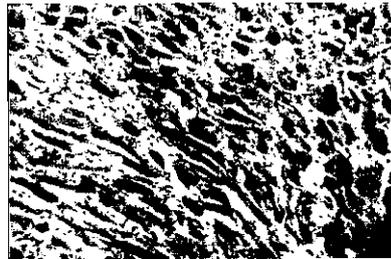


Fig. 13

【 図 1 4 】



Fig. 14

【 図 1 6 】

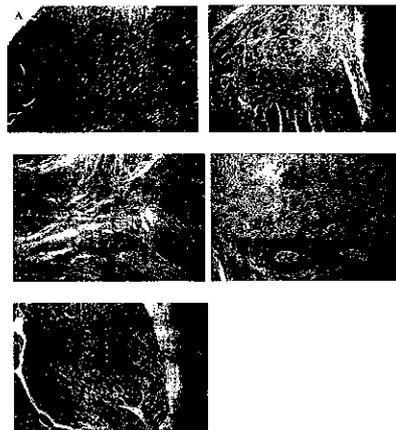


Fig. 16

【 図 1 5 】

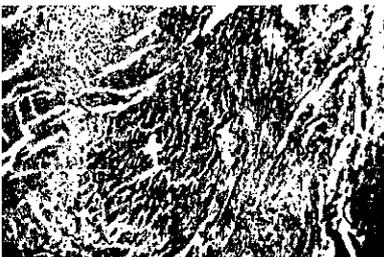


Fig. 15

【 図 17 】

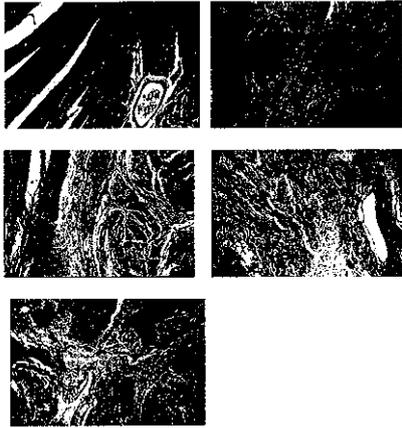


Fig.17

【 図 18 】

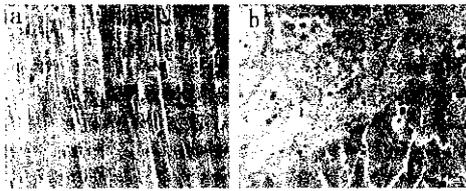


Fig.18

【 図 22 】

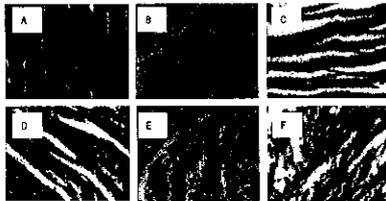


Fig. 22

【 図 23 】

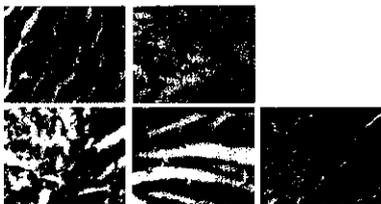


Fig. 23

【 図 24 】

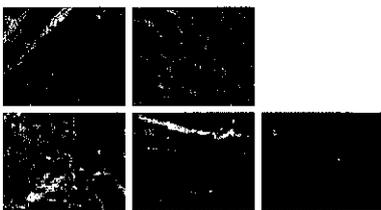
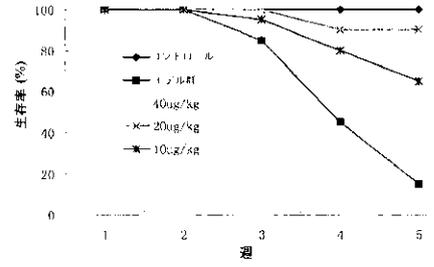


Fig.24

【 図 19 】



【 図 20 】

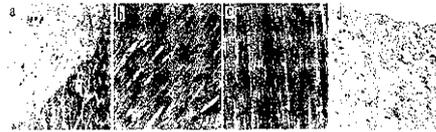


Fig.20

【 図 21 】

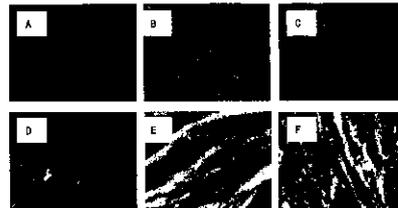


Fig.21

## 【手続補正書】

【提出日】平成17年1月25日(2005.1.25)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

組み合わせであって、有効量のニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、または該ニューレギュリンの産生および/もしくは機能を増強する薬剤、ならびにウイルス性心筋炎もしくは拡張型(うっ血性)心筋症(DCM)のための有効量の予防剤もしくは治療剤を含む、組み合わせ。

【請求項2】

前記ニューレギュリンが、Erbb2-Erbb4レセプターとの結合を通じて、その抗ウイルス性心筋炎活性または抗DCM活性を発揮する、請求項1に記載の組み合わせ。

【請求項3】

前記ニューレギュリンが、ニューレギュリン1、ニューレギュリン2、ニューレギュリン3、およびニューレギュリン4からなる群より選択される、請求項1に記載の組み合わせ。

【請求項4】

前記ニューレギュリン1がニューレギュリン2またはニューレギュリン2である、請求項3に記載の組み合わせ。

【請求項5】

前記ニューレギュリンフラグメントが、配列番号4に示されるアミノ酸配列を含むニューレギュリン2フラグメントである、請求項1に記載の組み合わせ。

【請求項6】

前記ウイルス性心筋炎のための予防剤または治療剤が、抗生物質、心臓保護剤、抗酸化剤、および心筋栄養剤からなる群より選択される、請求項1に記載の組み合わせ。

【請求項7】

前記抗生物質がペニシリンである、請求項6に記載の組み合わせ。

【請求項8】

前記心臓保護剤がタウリンである、請求項6に記載の組み合わせ。

【請求項9】

前記抗酸化剤が、ビタミンC、ビタミンE、およびコエンザイムQ10からなる群より選択される、請求項6に記載の組み合わせ。

【請求項10】

前記心筋栄養剤がエネルギーの組み合わせである、請求項6に記載の組み合わせ。

【請求項11】

前記DCMのための予防剤または治療剤が、心臓強壮剤、利尿剤、アンギオテンシンI変換酵素インヒビター(ACEI)、カルシウムアンタゴニスト、およびレセプターアンタゴニストからなる群より選択される、請求項1に記載の組み合わせ。

【請求項12】

前記心臓強壮剤がジゴキシンまたはセジラニドである、請求項11に記載の組み合わせ。

【請求項13】

前記利尿剤が、炭酸脱水素酵素インヒビター、浸透圧利尿剤、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ シンポートインヒビター、 $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$ シンポートインヒビター、腎臓上皮 $\text{Na}^+$ チャネルインヒビター、および鉍質コルチコイドレセプターアンタゴニストからなる群より選択される、請求項11に記載の組み合わせ。

## 【請求項 14】

前記カルシウムアンタゴニストがアムロジピンである、請求項 11 に記載の組み合わせ。

## 【請求項 15】

前記 - レセプターアンタゴニストがカルベジロールである、請求項 11 に記載の組み合わせ。

## 【請求項 16】

薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤をさらに含む、請求項 1 に記載の組み合わせ。

## 【請求項 17】

キットであって、容器中の請求項 1 に記載の組み合わせ、および該組み合わせを用いてウイルス性心筋炎または DCM を予防、処置、または遅延するための指示書を備える、キット。

## 【請求項 18】

哺乳動物におけるウイルス性心筋炎または拡張型（うっ血性）心筋症（DCM）を予防、処置、または遅延するための組成物であって、有効量のニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、または該ニューレギュリンの産生および/もしくは機能を増強する薬剤を含み、それによって、該ウイルス性心筋炎または DCM が予防、処置、または遅延される、組成物。

## 【請求項 19】

前記ニューレギュリンが、Erbb2 - Erbb4 レセプターとの結合を通じて、その抗ウイルス性心筋炎活性または抗 DCM 活性を発揮する、請求項 18 に記載の組成物。

## 【請求項 20】

前記ニューレギュリンが、ニューレギュリン 1、ニューレギュリン 2、ニューレギュリン 3、およびニューレギュリン 4 からなる群より選択される、請求項 18 に記載の組成物。

## 【請求項 21】

前記ニューレギュリン 1 がニューレギュリン 2 またはニューレギュリン 2 である、請求項 20 に記載の組成物。

## 【請求項 22】

前記ニューレギュリンフラグメントが、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含むニューレギュリン 2 フラグメントである、請求項 18 に記載の組成物。

## 【請求項 23】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 18 に記載の組成物。

## 【請求項 24】

前記ウイルス性心筋炎が、Coxsackie Group A ウイルス、Coxsackie Group B ウイルス、ECHO ウイルス、およびポリオウイルスからなる群より選択されるウイルスの感染により引き起こされるかまたは該ウイルスの感染に付随する、請求項 18 に記載の組成物。

## 【請求項 25】

前記ウイルス性心筋炎が、Coxsackie Group B ウイルスの感染により引き起こされるかまたは該ウイルスの感染に付随する、請求項 18 に記載の組成物。

## 【請求項 26】

前記ウイルス性心筋炎が、心外膜炎または心内膜炎を併発する、請求項 18 に記載の組成物。

## 【請求項 27】

前記ウイルス性心筋炎が、心筋の損傷、心臓機能障害、不整脈、全身性症候群、および心筋症からなる群より選択される臨床的特長を有する、請求項 18 に記載の組成物。

## 【請求項 28】

前記ウイルス性心筋炎が、急性または慢性のウイルス性心筋炎である、請求項 18 に記載の組成物。

## 【請求項 29】

前記ウイルス性心筋炎が、不整脈、心不全、および心臓ショックからなる群より選択される臨床的特長を有する、請求項 28 に記載の組成物。

【請求項 30】

前記ウイルス性心筋炎が、心臓肥大および/または永久心筋損傷により長期化する、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 31】

前記 DCM が、心室肥大、心筋ポンプ機能不全、およびうっ血性心不全からなる群より選択される臨床的特長を有する、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 32】

前記組成物が、薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤と共に投与される、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 33】

ニューレギュリタンパク質またはその機能的フラグメントが投与される、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 34】

ニューレギュリタンパク質またはその機能的フラグメントをコードする核酸を含む、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 35】

前記組成物が、ウイルス性心筋炎または DCM のための予防剤または治療剤と共に投与される、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 36】

前記組成物が、前記ウイルス性心筋炎または DCM のための予防剤または治療剤の投与前、同時、またはその後投与される、請求項 35 に記載の組成物。

【請求項 37】

前記ウイルス性心筋炎のための予防剤または治療剤が、抗生物質、心臓保護剤、抗酸化剤、および心筋栄養剤からなる群より選択される、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 38】

前記抗生物質がペニシリンである、請求項 37 に記載の組成物。

【請求項 39】

前記心臓保護剤がタウリンである、請求項 37 に記載の組成物。

【請求項 40】

前記抗酸化剤が、ビタミン C、ビタミン E、およびコエンザイム Q10 からなる群より選択される、請求項 37 に記載の組成物。

【請求項 41】

前記心筋栄養剤がエネルギーの組み合わせである、請求項 37 に記載の組成物。

【請求項 42】

前記 DCM のための予防剤または治療剤が、心臓強壯剤、利尿剤、アンギオテンシン I 変換酵素インヒビター (ACEI)、カルシウムアンタゴニスト、および  $\beta$ -レセプターアンタゴニストからなる群より選択される、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 43】

前記心臓強壯剤がジゴキシンまたはセジラニドである、請求項 42 に記載の組成物。

【請求項 44】

前記利尿剤が、炭酸脱水素酵素インヒビター、浸透圧利尿剤、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  シンポートインヒビター、 $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$  シンポートインヒビター、腎臓上皮  $\text{Na}^+$  チャネルインヒビター、および鉍質コルチコイドレセプターアンタゴニストからなる群より選択される、請求項 42 に記載の組成物。

【請求項 45】

前記カルシウムアンタゴニストがアムロジピンである、請求項 42 に記載の組成物。

【請求項 46】

前記  $\beta$ -レセプターアンタゴニストがカルベジロールである、請求項 42 に記載の組成物。

。

【請求項 47】

前記ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸が、約 25  $\mu\text{g}$  ~ 約 2,500  $\mu\text{g}$  の用量範囲を有する、請求項 18 に記載の薬学的組成物。

【請求項 48】

キットであって、容器中の請求項 18 に記載の薬学的組成物、および該組成物を用いてウイルス性心筋炎または DCM を予防、処置、または遅延するための指示書を備える、キット。

【請求項 49】

その予防、処置、または遅延が必要とされるかまたは望ましい哺乳動物における心臓毒性を予防、処置、または遅延するための キット であって、有効量の予防剤または治療剤、および有効量の (i) ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント； (ii) ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸；または (iii) 該ニューレギュリンの産生もしくは機能を増強する薬剤を含み、それによって、該予防剤または治療剤の投与に伴う心臓毒性が予防、処置、または遅延される、方法。

【請求項 50】

前記予防剤または治療剤が、前記心臓毒性を引き起こす酸素由来のフリーラジカルを産生する、請求項 49 に記載の キット。

【請求項 51】

前記予防剤または治療剤が、前記心臓毒性を引き起こす脂質可酸化を増強する、請求項 54 に記載の キット。

【請求項 52】

前記予防、処置、または遅延される心臓毒性が、頻拍、不整脈、およびうっ血性心不全からなる群より選択される、請求項 49 に記載の キット。

【請求項 53】

前記予防、処置、または遅延される心臓毒性が、急性または慢性の心臓毒性である、請求項 49 に記載の キット。

【請求項 54】

前記急性心臓毒性が、洞頻拍、不整脈、伝導ブロック、および ST-T セグメントの変質からなる群より選択される臨床的特長を有する、請求項 53 に記載の キット。

【請求項 55】

前記慢性心臓毒性が、不可逆的なうっ血性心不全の臨床的特長を有する、請求項 53 に記載の キット。

【請求項 56】

前記予防、処置、または遅延される心臓毒性が、左心室駆出フラクシオン (LVEF) の減少、一回拍出量 (SV) の減少、心拍出量 (CO) の減少、または心係数 (CI) の減少を含む、請求項 49 に記載の キット。

【請求項 57】

前記予防、処置、または遅延される心臓毒性が、左心室の収縮およびポンプ能力の阻害を含む、請求項 49 に記載の キット。

【請求項 58】

前記予防剤または治療剤が、抗新生物剤、抗精神病剤、三環系抗うつ剤、インターフェロン、インターロイキン、および抗感染剤からなる群より選択される、請求項 49 に記載の キット。

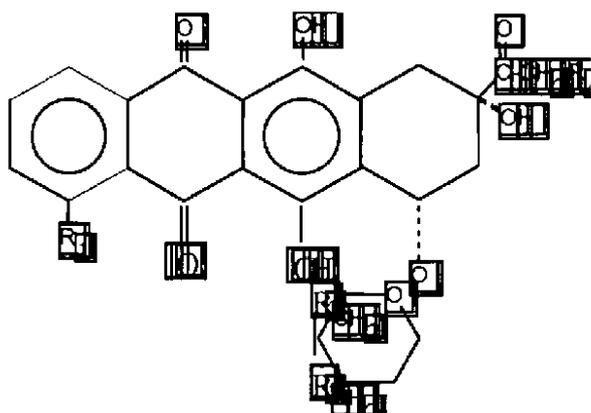
【請求項 59】

前記抗新生物剤がアントラサイクリン抗新生物剤である、請求項 58 に記載の キット。

【請求項 60】

前記アントラサイクリン抗新生物剤が、以下の式 I :

## 【化 1】



を有し、ここで、R 1 はメトキシまたは水素であり；ならびにR 2、R 3、およびR 4 は、ヒドロキシまたは水素である、請求項 5 9 に記載のキット。

## 【請求項 6 1】

前記アントラサイクリン抗新生物剤が、アドリアマイシン（またはドキシソルピシン）、ダウノルピシン、エピルピシン、イダルピシン、ミトキサントロン、マイトマイシン、プレオマシイン、シクロホフファミド、フルオロウラシル、アクチノマイシン D、およびピンクリスチンからなる群より選択される、請求項 5 9 に記載のキット。

## 【請求項 6 2】

前記アントラサイクリン抗新生物剤がアドリアマイシンである、請求項 6 1 に記載のキット。

## 【請求項 6 3】

前記抗精神病剤が、クロルプロマジン、パーフェナジン、またはトリフルペラジンからなる群より選択される、請求項 5 8 に記載のキット。

## 【請求項 6 4】

前記三環系抗うつ剤が、クロリミプラミン、アミトリプチリン、およびドキシセピンからなる群より選択される、請求項 5 8 に記載のキット。

## 【請求項 6 5】

前記インターフェロンがインターフェロン - である、請求項 5 8 に記載のキット。

## 【請求項 6 6】

前記インターロイキンがインターロイキン - 2 である、請求項 5 8 に記載のキット。

## 【請求項 6 7】

前記抗感染剤がエメチンである、請求項 5 8 に記載のキット。

## 【請求項 6 8】

前記ニューレギュリンが、ニューレギュリン 1、ニューレギュリン 2、ニューレギュリン 3、およびニューレギュリン 4 からなる群より選択される、請求項 4 9 に記載のキット。

## 【請求項 6 9】

前記ニューレギュリン 1 がニューレギュリン 2 またはニューレギュリン 2 である、請求項 6 8 に記載のキット。

## 【請求項 7 0】

前記ニューレギュリンフラグメントが、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含むニューレギュリン 2 である、請求項 6 9 に記載のキット。

## 【請求項 7 1】

前記ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、または該ニューレギュリンの産生または機能を増強する薬剤が、薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤と

共に投与される、請求項 49 に記載の キット。

【請求項 72】

ニューレギュリタンパク質またはその機能的フラグメントが投与される、請求項 71 に記載の キット。

【請求項 73】

ニューレギュリタンパク質またはその機能的フラグメントをコードする核酸が投与される、請求項 71 に記載の キット。

【請求項 74】

前記ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、または該ニューレギュリンの産生または機能を増強する薬剤が、予防剤または治療剤の投与の前、同時、またはその後に投与される、請求項 49 に記載の キット。

【請求項 75】

前記予防剤または治療剤は、該予防剤または治療剤が、ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、または該ニューレギュリンの産生もしくは機能を増強する薬剤の非存在下で投与される場合に最大限許容される量よりも高い量で投与される、請求項 49 に記載の キット。

【請求項 76】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 49 に記載の キット。

【請求項 77】

前記ヒトが、肺癌、乳癌、膀胱癌、精巣癌、甲状腺癌、柔組織癌、骨肉腫、神経芽腫、急性白血病、悪性リンパ腫、胃癌、肝臓癌、食道癌、および頸部癌からなる群より選択される悪性腫瘍を有する、請求項 76 に記載の キット。

【請求項 78】

組み合わせであって、有効量のニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、または該ニューレギュリンの産生および/もしくは機能を増強する薬剤、ならびに心筋梗塞のための有効量の予防剤もしくは治療剤を含む、組み合わせ。

【請求項 79】

前記ニューレギュリンが、Erbb2 - Erbb4 レセプターとの結合を通じて、その抗心筋梗塞活性を発揮する、請求項 78 に記載の組み合わせ。

【請求項 80】

前記ニューレギュリンが、ニューレギュリン 1、ニューレギュリン 2、ニューレギュリン 3、およびニューレギュリン 4 からなる群より選択される、請求項 78 に記載の組み合わせ。

【請求項 81】

前記ニューレギュリン 1 がニューレギュリン 2 またはニューレギュリン 2 である、請求項 80 に記載の組み合わせ。

【請求項 82】

前記ニューレギュリンフラグメントが、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含むニューレギュリン 2 フラグメントである、請求項 78 に記載の組み合わせ。

【請求項 83】

前記ウイルス性心筋炎の予防剤または治療剤が、アンジオテンシン I 変換酵素インヒビター (ACEI)、カルシウムアンタゴニスト、 $\beta$ -レセプターアンタゴニスト、アスピリン、アトロピン、ニトログリセリン、スコポールアミン、および血栓崩壊剤からなる群より選択される、請求項 78 に記載の組み合わせ。

【請求項 84】

前記 ACEI が、カプトプリル、ラムプリル、リシノプリル、ゾフェノプリル、およびトランドラプリルからなる群より選択される、請求項 83 に記載の組み合わせ。

## 【請求項 85】

前記カルシウムアンタゴニストがジルチアゼムである、請求項 83 に記載の組み合わせ。

## 【請求項 86】

前記 - レセプターアンタゴニストがプロパノールオール、メトプロロール、アテノールオール、およびチモールオールからなる群より選択される、請求項 83 に記載の組み合わせ。

## 【請求項 87】

前記血栓崩壊剤が、ストレプトキナーゼ、t - P A、およびアニストレプラーゼからなる群より選択される、請求項 83 に記載の組み合わせ。

## 【請求項 88】

薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤をさらに含む、請求項 78 に記載の組み合わせ。

## 【請求項 89】

キットであって、容器中の請求項 78 に記載の組み合わせ、および該組み合わせを用いて心筋梗塞を予防、処置、または遅延するための指示書を備える、キット。

## 【請求項 90】

哺乳動物における心筋梗塞を予防、処置、または遅延するための組成物であって、有効量のニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、または該ニューレギュリンの産生および/もしくは機能を増強する薬剤を含む、それによって、該心筋梗塞が予防、処置、または遅延される、組成物。

## 【請求項 91】

前記ニューレギュリンが、E r b B 2 - E r b B 4 レセプターとの結合を通じて、その抗心筋梗塞活性を発揮する、請求項 90 に記載の組成物。

## 【請求項 92】

前記ニューレギュリンが、ニューレギュリン 1、ニューレギュリン 2、ニューレギュリン 3、およびニューレギュリン 4 からなる群より選択される、請求項 90 に記載の組成物。

## 【請求項 93】

前記ニューレギュリン 1 がニューレギュリン 2 またはニューレギュリン 2 である、請求項 92 に記載の組成物。

## 【請求項 94】

前記ニューレギュリンフラグメントが、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含むニューレギュリン 2 フラグメントである、請求項 90 に記載の組成物。

## 【請求項 95】

前記ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、または該ニューレギュリンの産生および/もしくは機能を増強する薬剤が、前記心筋梗塞に付随する左心室拡張終期 ( L V E D D ) および収縮末期直径 ( L V E S D ) の増加をアンタゴナイズする、請求項 90 に記載の組成物。

## 【請求項 96】

前記ニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメント、またはニューレギュリタンパク質もしくはその機能的フラグメントをコードする核酸、または該ニューレギュリンの産生および/もしくは機能を増強する薬剤が、前記心筋梗塞に伴う左心室 E F の減少をアンタゴナイズする、請求項 90 に記載の組成物。

## 【請求項 97】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 90 に記載の組成物。

## 【請求項 98】

前記心筋梗塞が、左心室拡張、減少した収縮機能、および増加した充填圧からなる群より選択される臨床的特長を有する、請求項 90 に記載の組成物。

## 【請求項 99】

前記組成物が、薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤と共に投与される、請求項 90 に記載の組成物。

【請求項 100】

ニューレギュリタンパク質またはその機能的フラグメントを含む、請求項 90 に記載の組成物。

【請求項 101】

ニューレギュリタンパク質またはその機能的フラグメントをコードする核酸を含む、請求項 90 に記載の組成物。

【請求項 102】

前記組成物が、心筋梗塞のための予防剤または治療剤と共に投与される、請求項 90 に記載の組成物。

【請求項 103】

前記ウイルス性心筋炎の予防剤または治療剤が、アンギオテンシン I 変換酵素インヒビター (ACEI)、カルシウムアンタゴニスト、 $\beta$ -レセプターアンタゴニスト、アスピリン、アトロピン、ニトログリセリン、スコポールアミン、および血栓崩壊剤からなる群より選択される、請求項 102 に記載の組成物。

【請求項 104】

前記 ACEI が、カプトプリル、ラムプリル、リシノプリル、ゾフェノプリル、およびトランドラプリルからなる群より選択される、請求項 108 に記載の組成物。

【請求項 105】

前記カルシウムアンタゴニストがジルチアゼムである、請求項 103 に記載の組成物。

【請求項 106】

前記  $\beta$ -レセプターアンタゴニストがプロパノールオール、メトプロロール、アテノールオール、およびチモールオールからなる群より選択される、請求項 103 に記載の組成物。

【請求項 107】

前記血栓崩壊剤が、ストレプトキナーゼ、t-PA、およびアニストレプラーゼからなる群より選択される、請求項 103 に記載の組成物。

【請求項 108】

前記組成物が、インビボで投与される、請求項 90 に記載の組成物。

【請求項 109】

哺乳動物における疾患を予防、処置、または遅延するための薬学的組成物であって、ニューレギュリタンパク質またはその機能的フラグメントを：

(a) 約 170 U / kg 以下の安全用量で；または

(b) 約 3,600 U / kg 以下の総レジメンで、

含む、薬学的組成物。

【請求項 110】

約 21 日または約 21 日未満で投与される、請求項 109 に記載の薬学的組成物。

【請求項 111】

連続的にまたは間欠的に投与される、請求項 109 に記載の薬学的組成物。

【請求項 112】

薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤をさらに含む、請求項 109 に記載の薬学的組成物。

【請求項 113】

前記ニューレギュリンが、Erbb2 - Erbb4 レセプターとの結合を通じて、その抗疾患活性を発揮する、請求項 109 に記載の薬学的組成物。

【請求項 114】

前記ニューレギュリンが、ニューレギュリン 1、ニューレギュリン 2、ニューレギュリン 3、およびニューレギュリン 4 からなる群より選択される、請求項 109 に記載の薬学的組成物。

## 【請求項 1 1 5】

前記ニューレギュリン 1 がニューレギュリン 2 またはニューレギュリン 2 である、請求項 1 1 4 に記載の薬学的組成物。

## 【請求項 1 1 6】

前記ニューレギュリンフラグメントが、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含むニューレギュリン 2 フラグメントである、請求項 1 1 5 に記載の薬学的組成物。

## 【請求項 1 1 7】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 1 1 4 に記載の薬学的組成物。

## 【請求項 1 1 8】

前記疾患が心血管疾患である、請求項 1 0 9 に記載の薬学的組成物。

## 【請求項 1 1 9】

静脈内投与のために処方されている、請求項 1 0 9 に記載の薬学的組成物。

## 【手続補正書】

【提出日】平成 17 年 5 月 9 日 (2005.5.9)

## 【手続補正 2】

【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】

2005532332000001.app

## 【 國際調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN03/00355
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC <sup>7</sup> A61K35/30; A61K38/00; A61K38/18; A61K38/46; A61K38/55; A61K48/00; C12N15/10; C07K14/475 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 <sup>7</sup> A61K, C07K, C12N, C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
GenBank, EMBL, DDBJ, PDB, PIR, WPI		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO0164877A2, (DECO-N) DECODE GENETICS EHF, 2001/09/07, Full-text	1-124
X	WO0064400A2, (BETH-N) BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENT, 2000/11/02/, Full-text	1-124
X	WO0037095A1, VICTOR CHANG CARDIAC RESEARCH (AU) et al, 2000/06/29, Full-text	1-124
X	WO9918976 A1, (CAMB-N) CAMBRIDGE NEUROSCIENCE INC, 1999/04/22, Full-text	1-124
<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 another 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>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 16 Jun 2003 (16.06.03)		Date of mailing of the international search report <b>03 JUL 2003 (03.07.03)</b>
Name and mailing address of the ISA/CN 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, 100088 Beijing, China Facsimile No. 86-10-62019451		Authorized officer <b>Wang Pengfei</b> Telephone No. 86-10-62093145

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CN03/00355

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
WO0164877 A2	2001/09/07	AU200141839 A	2001/09/12
WO0064400 A2	2000/11/02	AU200049744 A	2000/11/10
WO0037095 A1	2000/06/29	EP1158998 A1	2001/12/05
		AU200024224 A	2000/07/12
WO9918976 A1	1999/04/22	JP2001519400T	2001/10/23
		AU9604298 A	1999/05/03
		EP1028735 A1	2000/08/23
		KR2001031103 A	2001/04/16

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/185	A 6 1 K 31/185	
A 6 1 K 31/355	A 6 1 K 31/355	
A 6 1 K 31/375	A 6 1 K 31/375	
A 6 1 K 31/401	A 6 1 K 31/401	
A 6 1 K 31/403	A 6 1 K 31/403	
A 6 1 K 31/43	A 6 1 K 31/43	
A 6 1 K 31/4422	A 6 1 K 31/4422	
A 6 1 K 31/46	A 6 1 K 31/46	
A 6 1 K 31/5415	A 6 1 K 31/5415	
A 6 1 K 31/554	A 6 1 K 31/554	
A 6 1 K 31/616	A 6 1 K 31/616	
A 6 1 K 31/704	A 6 1 K 31/704	
A 6 1 K 38/21	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 38/45	A 6 1 K 45/06	
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 45/06	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 9/04	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/06	
A 6 1 P 9/04	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/06	A 6 1 K 37/66	G
A 6 1 P 9/10	A 6 1 K 37/52	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,HU,IE,IT,LU,MC,NL,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,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,M W,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA03 AA13 AA19 AA20 BA02 BA44 DA21 DA22 DC21  
MA02 MA66 NA05 ZA361 ZA362 ZA372 ZA381 ZA401 ZA422 ZA542  
ZA832 ZB322 ZC202 ZC282 ZC372 ZC432 ZC502  
4C086 AA01 AA02 BA18 BC07 BC12 BC26 BC92 CB15 CC01 DA26  
EA10 EA19 GA16 MA02 MA04 MA66 NA05 ZA12 ZA18 ZA36  
ZB32 ZC28 ZC29 ZC37 ZC43 ZC50  
4C206 AA01 AA02 DB18 EA07 FA07 FA21 KA01 KA05 MA02 MA04  
MA14 MA17 MA28 MA86 NA05 ZA36 ZC43