

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2002 - 540070

(P2002 - 540070A)

(43)公表日 平成14年11月26日(2002.11.26)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 0 7 K 14/47	ZNA	C 0 7 K 14/47	ZNA 4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/395		A 6 1 K 39/395	D 4 C 0 8 5
			N 4 H 0 4 5
45/00		45/00	
A 6 1 P 9/04		A 6 1 P 9/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 48数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 598539(P2000 - 598539)

(86) (22)出願日 平成12年2月11日(2000.2.11)

(85)翻訳文提出日 平成13年8月13日(2001.8.13)

(86)国際出願番号 PCT/US00/03669

(87)国際公開番号 W000/47624

(87)国際公開日 平成12年8月17日(2000.8.17)

(31)優先権主張番号 60/119,921

(32)優先日 平成11年2月12日(1999.2.12)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ユニバーシティ オブ ルイビル リサーチ
ファウンデーション, インコーポレイ
ティド
アメリカ合衆国, ケンタッキー 40292, ルイ
ビル, ジュエット ホール, ユニバーシティ
オブ ルイビル

(72)発明者 パルデス, ローランド ジュニア
アメリカ合衆国, ケンタッキー 40067, シン
プソンビル, コノー ステーション ロード
1629

(74)代理人 弁理士 石田 敬 (外 4 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ジヒドロウアベイン様因子並びに診断及び治療組成物及び方法

(57)【要約】

抗 O L F 抗体との結合のために哺乳類ウアベイン様因子 (O L F) と実質的に交差反応できないが、抗 d h o 抗体との結合のために植物関連ジヒドロウアベイン (d h o) と交差反応し、196 nm で最大 u . v . 吸光度を有し、非ペプチド、非脂質性化学構造及び完全水素添加ラクトン環を有し、O L F の10分の1及び植物関連ジヒドロウアベインの3倍である濃度依存性 N a ⁺、K ⁺ - A T P アーゼ (ナトリウムポンプ) 触媒的阻害活性、並びに d h o とほぼ同一の高圧液体クロマトグラフィー溶離時間を有する新規哺乳類ジヒドロウアベイン様因子が開示される。この因子は、うっ血性心不全の治療のために有用である。哺乳類 d h - O L F に対する親和性を有するが、O L F に対しては有さない抗体及び抗体断片並びに診断及び治療方法は、抗体及び抗体の定量手段を含み、そして高レベルの O L F または D h - O L F により引き起こされる症状を処置するために有用である。植物関連ジヒドロウアベインの2つの異性体が単離された。これらの組成物及び方法は、ナトリウムポンプ活性低減に関連した種々の疾患及び症状を特性化するのに適している。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 植物関連ジヒドロウアベインに対して生じた抗体との結合反応性を有する精製哺乳類ジヒドロウアベイン様因子(Dh-OLF)。

【請求項2】 dh oと同様の高圧液体クロマトグラフィー溶離パターンを有する請求項1の因子。

【請求項3】 植物由来ウアベインまたは哺乳類ウアベイン様ナトリウムポンプ抑制性因子(OLF)に対して生じた抗体との実質的結合反応性を欠く請求項1の因子。

【請求項4】 ナトリウムポンプ活性の抑制に関してOLFの10分の1及びdh oの3倍の効力を有する請求項1の因子。

【請求項5】 ヒト起源である請求項1の因子。

【請求項6】 ウシ起源である請求項1の因子。

【請求項7】 OLFの還元により得られる請求項1の因子。

【請求項8】 請求項1の哺乳類Dh-OLF及び製薬上または獣医学的に許容可能な担体を含む医薬組成物。

【請求項9】 経口用、非経口用、眼用、徐放性及び腸コーティング処方物から成る群から選択される処方物の形態である請求項8の組成物。

【請求項10】 正常ナトリウムポンプ活性より高い活性に関連した症状を予防的または治療的に処置する方法であって、有効量の請求項8の組成物を治療を必要とする被験者に投与することを含む方法。

【請求項11】 組成物が非経口的に投与される請求項10の方法。

【請求項12】 組成物が経口的に投与される請求項10の方法。

【請求項13】 組成物が約1 μ g/体重kg～約1.5 mg/体重kgの量で投与される請求項10の方法。

【請求項14】 被験者がヒトである請求項11の方法。

【請求項15】 疾患または症状が心臓疾患であり、組成物が有効量で投与される請求項11の方法。

【請求項16】 心臓疾患がうっ血性心不全である請求項16の方法。

【請求項17】 疾患または症状が高血圧症であり、組成物が有効量で投与

される請求項11の方法。

【請求項18】 高血圧症が本態性高血圧症、甲状腺機能亢進症誘導性高血圧症及び妊娠誘導性または妊娠関連高血圧症から成る群から選択される請求項17の方法。

【請求項19】 疾患または症状が白内障であり、組成物が有効量で投与される請求項10の方法。

【請求項20】 疾患または症状がアルツハイマー病であり、組成物が有効量で投与される請求項10の方法。

【請求項21】 請求項1の因子に対して親和性を有する結合剤。

【請求項22】 ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Fv断片及びアプトマーから成る群から選択される請求項21の結合剤。

【請求項23】 請求項22の結合剤及び製薬上または獣医学的に許容可能な担体を含む医薬組成物。

【請求項24】 正常より高いOLFまたはDhOLFレベルに関連した症状を予防的または治療的に処置する方法であって、有効量の請求項23の組成物を治療を要する被験者に投与することを含む方法。

【請求項25】 約0.1～約1000 μ mol / 体重kgの量で抗体が投与される請求項24の方法。

【請求項26】 被験者がヒトである請求項24の方法。

【請求項27】 動物試料中のDh - O L Fを検出する定量的方法であって、以下の：

Dh - O L F分析物を含む疑いのある被験試料を得て、

Dh - O L Fまたはd h o異性体混合物に対する特異性を有するが、O L Lに対しては有さない固体支持体結合一次結合剤と被験試料を、前記一次結合剤が試料中に存在するあらゆる分析物と結合するのに有効な条件下で接触させて、結合剤 - 分析物複合体（単数または複数）を生成させ、

あらゆる基質 - 結合分析物 - 一次結合剤と結合するのに有効な条件下で基質結合一次結合剤 - 分析物複合体（単数または複数）を一次結合剤に特異的な標識化二次結合剤と接触させて、固体支持体 - 結合分析物 - 抗Dh - O L F結合剤 - 二

次結合剤または分析物 - 抗 d h e 結合剤 - 二次結合剤標識複合体 (単数または複数) を生成させ、

固体支持体結合標識の量を検出し、そして

複合体 (単数または複数) の量を同一または類似条件下で既知量の標準 D h - O L F または d h o に対して得られた複合体 (単数または複数) の量と比較することを含む方法。

【請求項 28】 結合剤が抗 D h - O L F 及び抗 d h o 抗体、断片またはアプトマーを含む請求項 26 の方法。

【請求項 29】 被験者がヒトである請求項 26 の方法。

【請求項 30】 動物試料中の D h - O L F を検出する定量的方法であって、H P L C により D h - O L F を単離し、D h - O L F に特徴的なピークの高さを、同一または類似条件下で分離された既知量の d h o - B の高さと比較する方法。

【請求項 31】 試料がヒトから採取される請求項 30 の方法。

【請求項 32】 精製された植物関連 d h o 異性体。

【請求項 33】 d h o - A である請求項 32 の異性体。

【請求項 34】 d h o - B である請求項 32 の異性体。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

発明の背景

産業上の利用分野

本発明は、哺乳類ウアベイン様因子(OLF)の分野に、特に新規ジヒドロウアベイン様因子(Dh-OLF)に、そしてナトリウム-カリウムポンプの調節に関連した症状及び疾患の検出及び治療のための、特にうっ血性心不全の検出及び治療のためのその使用に関する。本発明は、強心配糖体である植物カルデノリドにも関する。本発明は、過剰OLFまたはDh-OLFによる毒性の治療に有用な抗体及び抗体断片にも関する。

【0002】

背景の説明

2つの最も一般的に用いられる強心配糖体である植物カルデノリドであるジゴキシン及びウアベインは、心筋収縮能に及ぼすそれらの有益な作用、即ちそれらの陽性変力作用のために、一般にうっ血性心不全患者に投与される。陽性変力作用は一般的に、用量依存性の様式での心臓細胞の収縮能の増強を指す。これらの薬剤は、心室収縮の力及び速度の増大を生じ、心拍数の遅速も生じる。これら2つの作用は、より強い心拍を生じるために組合せる。しかしながら、強心配糖体は狭治療指数を有し、それらの使用にはしばしば、重度または致死性であり得る毒性作用が随伴する。

【0003】

強心配糖体の的確な作用様式は完全に分かっているわけではないが、しかしその作用はナトリウムポンプの調節により仲介されると考えられる。異常なナトリウムポンプ活性は、いくつかの疾患、例えばその中でも心臓血管性、神経学的、腎臓及び代謝性障害の病理生理学知見に關与すると仮定されている。これらの複合作用は、その他の分子の細胞移入を制御する場合のポンプの役割に関連し得る。

【0004】

Na⁺、K⁺-ATPアーゼ酵素またはナトリウムポンプは、哺乳類細胞の形質

膜を横切る Na^+ 及び K^+ イオンの電気化学的勾配を確立するのに関与する膜タンパク質である。この酵素により生成されるイオン勾配は、細胞中への必須栄養素の能動輸送に、浸透平衡及び細胞容積の調節に、そして励起可能細胞における静止膜電位保持に必要である。 Na^+ 、 K^+ -ATPアーゼ酵素は、ジギタリスのような強心配糖体に対する唯一の既知の受容体である。その他の観察の中でも多数の門(phylla)に及ぶジギタリス結合部位のしっかりした保存は、さらに哺乳類細胞における内因性ナトリウムポンプ阻害剤(SPI)の存在を示唆する。これらの仮説的哺乳類阻害剤は、ナトリウムポンプの活性の変調に関与し、in vivoナトリウムホメオスタシスに関与し得る。

【0005】

強心配糖体の投与の副作用の1つは、動脈性高血圧症である。過剰量の内因性因子も動脈性高血圧症を引き起こし得るが、これは種々の器官に関連した合併症の危険因子であると考えられる。高血漿レベルのウアベイン様化合物(OLC)は、鉱質コルチコイド高血圧症の2つの型である原発性アルドステロン症及び異所性コルチコトロピン症候群を有する患者で見出された。さらに、本態性高血圧症を有する患者の30~45%はOLCの血漿レベル増大を示し、血圧は統計学的にOLCレベルと相関した。現在利用可能な抗高血圧剤は有益であることが立証されているが、しかしそれらは高血圧によって引き起こされる作用の完全な逆転には未だ達していない。したがって、投与されたものであれ、内因性であれ、高レベルのウアベインの毒性作用を逆転するためには、現在利用可能なものより特異的且つ有効である作用物質が依然として必要とされている。持続性高血圧による器官損害の発生前に、患者における高血圧の発生を予測する手段を有することはさらに有益なことである。

【0006】

腎臓も血圧変動の変更に関連づけられてきた。血圧の上昇は、臨床形態の高血圧症、例えばリドル症候群、糖質コルチコイド抑制性アルドステロン症、並びに腎臓におけるナトリウム(Na^+)再吸収の構成的増大に密接に関連すると思われる見掛けの鉱質コルチコイド過剰症候群で観察されている。本態性高血圧症は、血圧増大と相互作用する遺伝的及び環境的因子に起因すると考えられる異質性

疾患であり、したがって遺伝子突然変異も高血圧症に関与し得るし、これらの遺伝子は最終共通経路に集中することが知られているため、結果は腎臓における Na^+ 再吸収増大及び/または Na^+ 排泄低減であり得る。しかしながら、 Na^+ 再吸収増大が高血圧をもたらす理由はまだ明らかではないが、しかし、塩保持及び血漿容積拡張がナトリウムポンプ阻害剤(SPI)の分泌の引き金となり、これがナトリウムの尿中排泄により細胞外流体容積を元に戻す。したがって、SPIの分泌増大は、サイトゾル Ca^{2+} も上昇させて、血管収縮を生じ、これが高血圧症の発症及び永続性を説明する。メカニズムが何であれ、高血圧症はナトリウム調節の異常機能に関連することが経験的に認められている。

【0007】

ウアベインの長期投与は、ラットにおける高血圧症の発症を引き起こすことが示されている。ウアベインに対するこれらのDahl塩感受性(S)ラットの免疫感作は、腎臓塊-塩類高血圧症(renal mass-saline hypertension)及び Na^+ -誘導性高血圧症における低減を防止した。

【0008】

植物カルデノリド、例えばウアベイン及びジゴキシンは、 Na^+ 、 K^+ -ATPアーゼ酵素(ナトリウムポンプ)の α -サブユニット上の高度保存エピトープと特異的に結合し、リン酸化中間物質を安定化することが示されている。この作用は、細胞膜を通過するナトリウム、カリウム及びその他の重要な生物学的化合物のポンプ関連輸送の抑制をもたらす。ホルモン軸は、ナトリウムポンプの植物カルデノリドと同様の哺乳類配位子による活性を調節することがさらに仮定されている。植物カルデノリドと同様の特性を有する2つの種類の哺乳類化合物：即ち、(1)ジゴキシン様因子、例えばDLFまたはDLIF、並びに(2)ウアベイン様因子、例えばOLFまたはHIFが今日までに見出されている。DLIF族は、一連の脱グリコシル化種及びジヒドロジゴキシン様異性体であるDh-DLIFを含む。シトクロム P_{450} は、近年、低DLIF免疫反応性を有する植物カルデノリドであるジヒドロジゴキシンの高DLIF免疫反応性を有するものへの転換を仲介することが示された。これは、低活性ジヒドロ種であるDh-DLIFの、より生物学的に活性な種であるDLIFへの考え得るin vivo代謝性転

換を示唆する。

【0009】

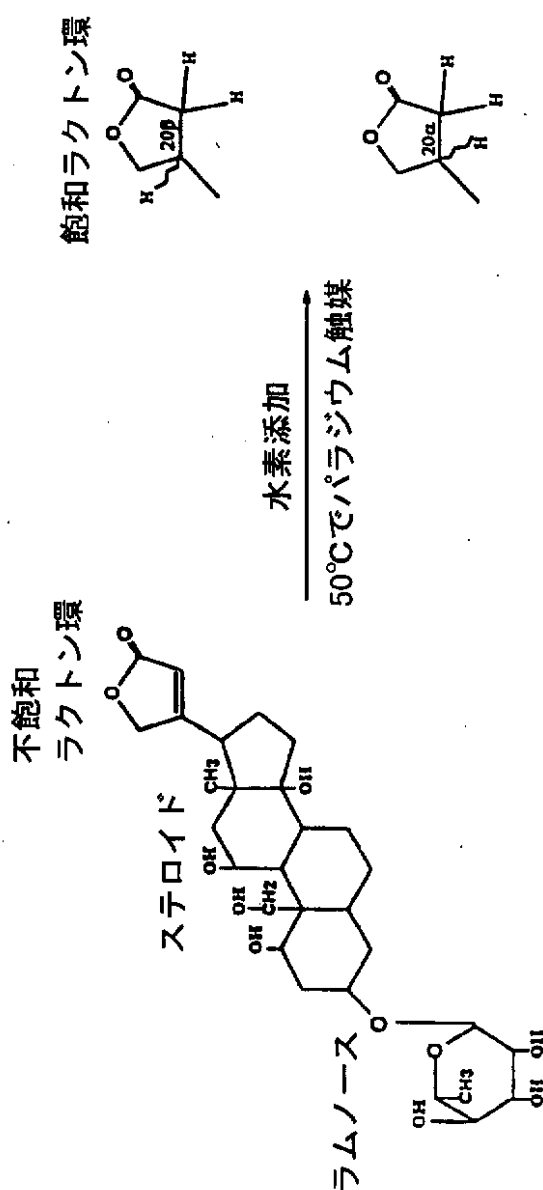
植物ウアベインに対するヒトOLF類似体の脱グリコシル化種の存在を、本発明者等は近年報告した。飽和ラクトン環を有する化学的還元形態のウアベインであるジヒドロウアベイン(dho)は、ウアベインの生物学的活性及びナトリウムポンプとのその相互作用を調べるために用いられてきた。ウアベイン及びジヒドロウアベインの化学式を以下に示す。

【0010】

【化1】

ジヒドロウアベイン
 $C_{28}H_{46}O_{12}$
 MW 586

ウアベイン
 $C_{29}H_{44}O_{12}$
 MW 584



【0011】

ウアベインは、 C_{17} 位置に結合した不飽和ラクトン環を有するステロイド核から成るアグリコン、 C_3 位置に結合した唯一の糖分子であるラムノースを含有する。ウアベインとジヒドロウアベイン(dho)との間の唯一の差は、後者が完全水素添加ラクトン環を有する点である。

【0012】

概して、還元ラクトン環形態のジゴキシン及びウアベインはともに、 Na^+ 、 K^+ ポンプ触媒活性の抑制に関して、それらの酸化相対物より相対的に低い能力を示す。しかしながら、それらは、組織から迅速に洗い落とされること等といった、むしろ有益なその他の生物物理学的特性を有する。

特定の分子構造に対する抗体は、当業界で既知の方法により、標的構造を有するマウスまたはウサギのような動物の免疫感作により作製し得る。特定のヒト分子に対して生じたポリクローナル及びモノクローナル抗体を含めた非ヒト抗体は、当業界で既知である診断及び療法のために用いられてきた。キメラ抗体は、ある種の可変ドメイン（反応性部分または相補性決定領域またはCDR）と別の種の定常ドメイン（枠組み構造領域、FR）との間の直接融合物である。マウスCDRがヒトFRに融合されたネズミ/ヒトキメラ抗体は、全ネズミ抗体よりヒトにおいては低免疫原性であることが示されている。生物活性分子のサイズは、組織標的利用可能性を増大し、基本的に単離されたCDRであるFv抗体を構成する重及び軽鎖定常部のほとんどを除去することにより、抗体の腎臓を通した最終的排泄を可能にするように、低減し得る。任意の種を抗体産生に用い得るが、しかし大量の抗体が必要とされる場合には、大型動物、例えばヒツジ、ヤギまたはウマを用いるのが有益である。しかしながら、あらゆる哺乳類を用い得る。ポリクローナルまたはモノクローナル供給源からの抗体または断片は、アフィニティー分離により精製し得る。これらの考え得る療法形態の抗体のすべてに共通するのは、分子をその配位子に誘導する必要なCDRである。

【0013】

イムノアッセイの開発は、診断目的の、特に動物及びヒト組織中の異なる内因性作用物質のレベルを確定するための抗体の利用を可能にした。イムノアッセイは、標準として用いられる抗原とのこの抗体の結合時に、そして同一抗体により結合される試料中の未知の分析物の量を標準と比較する場合に、既知量の既知の抗原の既知量の抗体との定量的結合によっている。両反応が同一培地中で実施される場合、未知の試料中に存在する分析物は、既知量の抗原との既知量の抗体の結合を妨げる。これらの検定の重要な工程は、結合抗体または抗原の非結合抗体または抗原からの分離である。この反応に関する多数の形状が、直接免疫測定、

競合的または置換検定等として周知である。定量的結果は、一般的に血球凝集検定、ラジオイムノアッセイ、酵素結合検定等により得られる。

【0014】

イムノアッセイでは、動物またはヒト組織中に存在する所定の分析物が、既知量の可溶化標準分析物と比較される。分析される最も一般的な組織は血液であり、特に血液からの血清及び/または血漿であるが、しかし尿、脳脊髄液、異なる血清調製物及び異なる動物及びヒト組織及び流体モルチンに検定される。内分泌学及び臨床化学においては、中でも特にホルモン、タンパク質及び脂質代謝物質のレベルを確定するために、酵素結合検定及びラジオイムノアッセイが用いられてきた。血液またはその他の組織中のある種の分子のレベルは、症状が発現する前の、しばしば非常に初期段階の、疾患状態を示し得る。これらの分子は、症状のマーカーと呼ばれる。

【0015】

したがって、ナトリウムポンプ機能を示すマーカーの存在を検出するための検定、特に迅速で、費用効果のある、そして高度の特殊技能者でなくても実行し得る検定が依然として必要とされている。本技術は、ナトリウムポンプ機能の制御を必要とする疾患の危険性がある集団並びにそのための治療を受けている患者のスクリーニングに直ちに適用可能である。

【0016】

発明の要約

本発明は、ナトリウムポンプ (Na^+ 、 K^+ - ATPアーゼ) を抑制し、それが *in vivo* で転換される哺乳類ウアベイン様因子 (OLF) に対するプロドラッグである精製された単離哺乳類ジヒドロウアベイン様因子 (Dh - OLF) に関する。逆に言えば、OLF は、それが *in vivo* で転換される Dh - OLF に対するプロドラッグである。Dh - OLF は、植物由来ジヒドロウアベイン (dho) と同様に、水素添加ラクトン環を有するが、しかし本発明の因子は、それをジヒドロウアベインとは異ならせる他の特性を有する。Dh - OLF は、約586の分子量を有し、抗ウアベイン抗体との結合のために哺乳類ウアベイン様 Na^+ 、 K^+ - ATPアーゼ阻害因子 (OLF) と実質的に交差反応できない。それが抗 dh

o抗体との結合のために植物ジヒドロウアベイン(dho)と交差反応するのは有意である。脱グリコシル化合物は糖含有因子と同様の免疫活性パターンを示し、このことは主要免疫原性がラクトン部分に残留することを示唆する。したがって、本発明を説明する目的で、OLF、Dh-OLF、ウアベイン及びdhoはそれらの脱グリコシル化類似体を含むよう意図される。「dho」は、異性体dho-A及びdho-Bから成る。Dh-OLFは、196 nmで最大uv吸光度を有し、280 nmで吸光性を欠くことにより立証されるような非ペプチド性化学構造、リパーゼ消化の欠如及び脂質染色による染色の欠如により立証されるような非脂質性化学構造、完全水素添加ラクトン環を有し、 Na^+ 、 K^+ -ATPアーゼ触媒活性の抑制に関してOLFの10分の1及び植物ジヒドロウアベインB(dho-B)の3倍の能力を有し、 Na^+ 、 K^+ -ATPアーゼ サブユニットのリン酸化に関してOLFの10分の1の及び植物dho-Bの3倍の能力を有し、 Na^+ 、 K^+ -ATPアーゼ触媒活性の濃度依存性抑制、 Na^+ 、 K^+ -ATPアーゼ サブユニットの濃度依存性リン酸化、並びにジヒドロウアベインとほぼ同一の高圧液体クロマトグラフィー溶離パターンを有する。

【0017】

内因性ウアベイン様因子(OLF及びDh-OLF)は、抗体あるいはそれらにまたはウアベインまたはジヒドロウアベインに特異的であるその他の結合剤を用いたuv分光測光法、分取高圧液体クロマトグラフィーまたはアフィニティー分離の使用を包含する方法により単離し得る。

【0018】

本発明は、Dh-OLFの異常レベルまたはDh-OLF対OLFの異常比に関連した疾患状態の早期査定をおこなうための、モノクローナル及びポリクローナル抗体及びそれらの断片に、並びに生物学的(動物)試料中のDh-OLF及び/またはOLFの検出のためのそれらの使用にも関する。抗体または好ましくはそれらの断片は、中でも代謝性疾患、心臓疾患、高血圧、腎障害、神経学的障害、例えばアルツハイマー病、精神医学的症状、眼疾患及び性機能不全を含めたDh-OLFレベルの増大に関連した種々の疾患の治療における療法的使用にも適している。モノクローナル抗体は、所望により、当業界で周知の方法によって

も作製し得る。

【0019】

さらに、本発明は、予防的または治療的有効量の本発明の抗体または抗d h o抗体または好ましくはこれらの抗体の断片を治療を要する被験者に投与することによるD h - O L FまたはO L Fのレベルを低減するためのin vivo方法も提供する。合成化合物、例えばアプトマーのようなその他の特異的結合剤が知られている。ウアベインまたはジヒドロウアベインまたはそれらの内因性類似体を結合するこのような特異的結合剤はすべて、本方法で同様に用い得る。

【0020】

被験試料中に存在するD h - O L F及び/またはO L Fのレベルは、この化合物またはd h o異性体混合物に対する親和性を有する抗体による因子の選択的結合と、その後の、標識化抗体F c - 結合剤を添加して生物学的試料中に存在するD h - O L Fの量と線状に相関するシグナルを生成することに拠っている本発明の診断検定の助けを借りて査定し得る。

【0021】

被験試料中に存在するD h - O L F及び/またはO L Fのレベルは、代替的には、定量的H P L Cにより査定し得るが、この場合、溶離ピークは既知量のD h - O L F及び/またはO L Fから得られるピークと比較される。50 でパラジウム触媒を用いたウアベインの水素添加は、2つの異性体(d h o - A及びd h o - B)を生成する。被験試料のD h - O L Fであると考えられる溶離ピークは、既知量のd h o - Bから得られるピークと比較され、D h - O L Fの濃度は、それぞれのピーク高の比較から概算される。

【0022】

O L F対D h - O L FまたはO L F対D h - O L Fの比は、被験者によって変わり得ることが知られている。比のこの変動は、D h - O L F及びO L Fの相互転換の可変性速度によっていると考えられる。O L Fはナトリウムポンプの活動時にD h - O L Fの10倍の活性を有するため、転換酵素(単数または複数)は、抗高血圧または抗低血圧薬の開発または試験のための新規な標的を提供する。

【0023】

添付の図面と結びつけて考えた場合に以下の詳細な説明を参照することによってよりよく理解されるようになるので、本発明の、及びその付随する利点の多くのより完全な理解は、容易に認知される。本発明の組成物及び方法は好ましい態様に関して記載されており、添付の特許請求の範囲に定義されているような本発明の精神及び範囲を逸脱しない限りいくつかの置換及び修正をなし得ることは、当業者には明らかである。

【0024】

好ましい態様の説明

本発明は、ナトリウム/カリウムポンプの機能不全及び/またはその機能の調節に関連した疾患及び症状を予防及び治療するための従来技術を改良するという本発明者等による要求から生じた。従来治療薬は、効き目がありすぎ、長期間残存し、及び/またはそれらの作用を変調するのが難しかった。それらの探究において、本発明者等は、独特の特性を有する哺乳類ジヒドロウアベイン様因子(Dh-OLF)の存在を確定し、単離し、特性化した。Dh-OLFは水素添加ラクトン環を有するが、しかしこの因子は、それをジヒドロウアベインとは異なる他の特性を有する。Dh-OLFは、UV分光測光法、ウアベイン及びジヒドロウアベイン(dho)の両方に特異的な抗体との交差反応性、並びに2つの別々のin vitroバイオアッセイ、Na⁺、K⁺-ATPアーゼ酵素活性の抑制及びNa⁺、K⁺-ATPアーゼ酵素サブユニットのリン酸化の助けにより単離される。本発明の哺乳類Dh-OLFは、HPLC上で、植物由来ジヒドロウアベイン(dho)の1つの独特の異性体と同時移動して、196 nmで最大吸光度を示し、220 nmでのOLFと比較した場合に実質的にモル吸光性の低減を示して、ナトリウムポンプ活性(Na⁺、K⁺-ATPアーゼ酵素)を抑制し、濃度依存性様式で酵素をリン酸化して、ジヒドロウアベインに特異的な抗体とは反応するが、しかしウアベインに特異的な抗体とは反応しないことが判明した。しかしながら、dhoとは異なり、Dh-OLFは、脱水素添加時に、1つだけの異性体ピークを示した。

【0025】

本発明の哺乳類Dh-OLFは、Na⁺、K⁺-ATPアーゼ酵素の触媒活性を

抑制するための能力 ($IC_{50} = 590 \text{ nM}$) は、その酸化相対物であるOLF ($IC_{50} = 60 \text{ nM}$) の約10分の1である、ということが本発明者等により見出された。さらに、本発明の作用物質は、同一酵素の触媒活性を抑制する効力が、植物起源のものであるジヒドロアベインの異性体の1つ (dho-B; $IC_{50} = 1700 \text{ nM}$) の約3倍である、ということも見出された。ナトリウムポンプの α -サブユニットのリン酸化を増強する本発明の作用物質の能力は、濃度依存性であることが見出された。

【0026】

本発明者は、ウシ副腎皮質 (収量 = 約 $0.36 \pm 0.34 \times 10^{-10} \text{ mol/g}$) から、並びにヒト血清 (収量 = 約 $50 \pm 0.46 \times 10^{-10} \text{ mol/g}$) から Dh-OLF を単離し得た。以下で提示される実験的開示において、Dh-OLF が同一組織中の内因性OLF よりはるかに豊富に存在することを本発明者は示す。Dh-OLF : OLF の比率が、ウシ副腎皮質では約22、そしてヒト血清では約13であるということ、彼等は見出した。哺乳類 Dh-OLF の存在は、それ自体、内因性OLF レベルの上昇または低減に対する明らかな *in vivo* 代謝架橋を提供する。さらに、OLF 対 Dh-OLF の比、またはその逆は、被験者によって、そして異なる時点での個々の被験者において変化する、ということが示される。したがって、本発明の作用物質は、被験者に投与した場合に、*in vivo* でOLF に転換されるプロドラッグとして用いるのにも適している。本発明の発見は、それ自体、ナトリウム/カリウムポンプの活性の制御に対して根元的である内因性哺乳類調節ホルモン軸の変調を可能にする。

【0027】

Na^+ 、 K^+ -ATPアーゼの α -サブユニットのウアベイン刺激Pi-リン酸化に関する種々の実験の結果は、 α -サブユニット上の特定の結合部位とのウアベインの結合の重要性を示す。ウアベイン及びその他の植物由来強心配糖体及び哺乳類ナトリウムポンプ阻害剤によるナトリウムポンプの抑制は、ATP分解の低減をもたらす。 Ca^{++} -ATPアーゼのようなATPアーゼ活性の多数のその他の刺激剤も典型的にはその他の組織ATPアーゼと結合するが、一方、ウアベイン刺激リン酸化は Na^+ 、 K^+ -ATPアーゼに特異的であり、したがってこの

ような妨害を回避する。内因性ウアベイン様因子とは異なって、植物由来d h o は、実際、ナトリウムポンプのウアベイン刺激リン酸化に関して、等モル濃度で、植物由来ウアベインのリン酸化活性の約82%を有する。このリン酸化においては、ホスフェート (P i) は、A T P加水分解中にA T Pによりリン酸化される N a⁺、K⁺ - A T Pアーゼの γ -サブユニットの同一アスパルチルアミノ酸中に共有的に組み込まれる。ウシ副腎皮質及びヒト血漿から単離されたO L F及びD h - O L Fはともに、N a⁺、K⁺ - A T Pアーゼの γ -サブユニット中にP iを組み入れることによりリン酸化を刺激する。P iのO L F及びD h - O L F刺激組み入れは、これらの因子の濃度に大きく依存している。リン酸化に必要なD h - O L Fの濃度(ゲル帯域の密度から概算)は、ナトリウムポンプ酵素の活性の抑制に必要とされるN a⁺、K⁺ - A T Pアーゼの濃度範囲と平行する。しかしながら、同様の活性を有する植物類似体とは異なり、O L FはD h - O L Fの10倍の活性を有する。

【0028】

ジヒドロ種はすべて、酸化プラチナ触媒を用いて室温で、またはパラジウム - 炭素触媒を用いて50℃で、植物酸化種、例えば、ウアベイン、ジゴキシン、ジギトキシン等の対応するシクロペンテノリドラクトン環の水素添加によりin vitroで生成し得る。ラクトン環結合の水素添加は、C - 20で非対称の二次中心を生じる。ジヒドロウアベインは、2つの異性体、即ちd h o - B及びd h o - Aを有するという事も本発明者等により示された。反対に、O L Fは、1つの二水素添加種、即ち、D h - O L Fを哺乳類組織中に有するようである。本特許は、ウシ副腎皮質及びヒト血漿から得られたD h - O L Fが同種であるという明らかな証拠を提供する。U . V . スペクトル及びクロマトグラフィー移動度により、O L F及びD h - O L Fの抗ウアベイン及び抗ヒドロウアベイン抗体との結合も、本発明者等は特性化した。下記に提示されるデータは、ヒト血清中の両因子の定量比及びモル濃度を示す。副腎はD h - O L F及びO L Fの豊富な供給源である。データは、一方ではO L FとD h - O L Fの、そして他方ではD L I FとD h - D L I Fの代謝的及び生理病理学的相互関係の明らかな見解を、並びにそれらの生成及び調節と副腎とのつながりを提示する。同様の内因性因子であるジヒ

ドロジゴキシン様因子 (Dh - D L I F) は、ウシ副腎皮質からのミクロソームによりジゴキシン様免疫反応性作用物質に代謝されることが示された (Qazzaz e t al . (1996) Clinical Chemistry 42:1092, 1099) 。 Dh - O L F は、プロドラッグとして外因的に投与され、代謝的に *in vivo* で O L F に転換される。逆に、O L R は、Dh - O L F のプロドラッグとして投与し得る。

【0029】

Dh - O L F / O L F 対の酸化 / 還元状態のラクトン環は、 Na^+ 、 K^+ - A T P アーゼ受容体との相互作用において中心的役割を演じる。最近の証拠は、他のジヒドロ種、例えばジヒドロジゴキシンが Na^+ 、 K^+ - A T P アーゼの特異的アイソフォームとの結合に関してジゴキシンに匹敵する親和性を有することを示唆する。逆に、Dh - O L F は、植物由来ウアベインと同様の (82%) 活性を有する植物由来 d h o に対比して、酸化形態より生物学的活性が低い。副腎における Dh - O L F と O L F との代謝的連関は、O L F の *in vivo* 生成及び循環中へのその分泌のためにプロドラッグとして Dh - O L F を利用する真の機会を提供する。転換工程は、10倍高い活性を有する O L F への Dh - O L F の転換を阻止することにより、高血圧症を治療するための新規な標的を提供する。高血圧症は、Dh - O L F の O L F への転換を刺激することにより治療し得る。

【0030】

逆に、O L F は、腸における細菌性転換により Dh - O L F を生成し、これは次に、循環中に吸収される。O L F は、O L F の経口投与により、または血液から腸への O L F の排出により、腸中に存在し、Dh - O L F への転換及びその後の再吸収を伴う。内因性 O L F の Dh - O L F への、及び / または Dh - O L F の O L F への *in vivo* 転換により変調される平衡が、明らかに認められる。したがって、副腎皮質中の、または特定の組織または器官中のそれらの相対的存在量は、Dh - O L F または抗 Dh - O L F の投与により、あるいはこれらの類似体の相互転換に影響を及ぼすその他の化合物により変調し得る。

【0031】

したがって、本発明は、約586の分子量の精製された単離哺乳類ジヒドロウアベイン様因子 (Dh - O L F) を提供し、196 nm で最大 *uv* 吸光度、280 nm で吸

光性を欠くことにより立証されるような非ペプチド性化学構造、並びにリパーゼ消化の欠如及び脂質染色による染色の欠如により立証されるような非脂質性化学構造を伴う完全水素添加ラクトン環を有する。さらに、Dh-OLFは、ジヒドロウアベイン(dho)と同様の高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)溶離パターンを有し、抗dho抗体との結合のために植物関連ジヒドロウアベイン(dho)と交差反応するが、しかし抗OLF抗体との結合のために哺乳類ウアベイン様因子(OLF)と実質的に交差反応できない。本因子は、OLFの10分の1及び植物関連ジヒドロウアベインB(dho-B)の3倍の効力で Na^+ 、 K^+ -ATPアーゼ活性を抑制し、OLFの10分の1及び植物関連ジヒドロウアベインB(dho-B)の3倍の効力で Na^+ 、 K^+ -ATPアーゼ-サブユニットをリン酸化する。本発明のDh-OLFは、濃度依存性様式で、 Na^+ 、 K^+ -ATPアーゼ触媒活性を抑制し、 Na^+ 、 K^+ -ATPアーゼ-サブユニットをリン酸化する。本発明の因子は、異なる純度で、例えば90%、95%、そして99%純度でも利用可能である。さらに精製された形態の因子は、本発明の抗Dh-OLF抗体との親和性分離により得られる。本因子は、粉末としてフリーズドライまたは凍結乾燥形態で、または溶液の形態で提供し得る。

【0032】

ここに報告された知見は、中でもヒトであれ、非ヒトサルであれ霊長類起源の、ウシ、ヒツジ、ネズミ、ウマ、ウサギ、ヤギ、ウシ及びモルモット起源のものであり得る哺乳類因子に関する。ヒトの使用に関しては、好ましいのは、ヒト及びウシ起源の因子である。しかしながら、その他も利用し得る。ここに記載された哺乳類Dh-OLF因子は、in vivo及びin vitroでOLFに容易に転換される。OLFは同様に、in vivo及びin vitroでDh-OLFに転換し得る。したがって、各々が、互いのためのプロドラッグとして投与し得る。例えば、酸化は、NADPH、及びNADPH依存性レダクターゼの存在下で、シトクロムP₄₅を用いて生じ得る。哺乳類Dh-OLF因子は、嫌気性、通性嫌気性または好気性細菌によるOLFの細菌的還元により容易に得られる。真正細菌種はこの還元特に特に有用である、ということが判明した。実験室では、還元は、当業界で既知のように、触媒の助けを借りてH₂を用いてOLFを水素添加することにより

得られる。

【0033】

本発明の因子は、好ましくは製薬上または獣医学的に許容可能な担体と組み合わされた組成物の形態でも提供される。本発明で用いるための製剤組成物は全身性及び局所性処方物を含み、これらの中で好ましいのは、吸入、経口、直腸、膺、鼻腔、眼、視覚、管腔内、器官内またはその他の治療様式に適した処方物である。

【0034】

好ましい処方物は、経口用担体、組成物、及び任意に腸コーティングを含む経口処方物である。腸コーティングは、それらの構成成分及びそれらの製造方法と同様に当業界で既知であり、したがって、本特許中で説明する必要はない。別の好ましい処方物は、組成物を含む舌下処方物であって、この場合、風味剤及び不活性希釈剤はスクロース、アカシアゴム、トラガカントゴム、ゼラチン及びグリセリンから成る群から選択される。その他の担体及び希釈剤は、当業者に既知であるように利用し得る。本特許は、本因子の、そして任意に同様に以下で記載されるようなその他の作用物質の溶液、懸濁液または乳濁液を含む非経口処方物も提供する。これらの量は、重複活性を有する付加的な作用物質が下記のように含まれる場合には、調整し得る。

【0035】

投与量は、被験者の年齢、体重及び症状によって変わる。治療は、最適用量未満の本発明の作用物質（因子またはその塩の1つ）を含有する小投与量で開始され、所望の、またはその状況下で最適の作用が達成されるまで増大し得る。概して、投与量は、約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ までである。一般に好ましいのは、約2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ / 被験者の体重kgの投与量であり、さらに好ましいのは、約8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ / 被験者の体重kgである。しかしながら、より高いまたはより低い用量も意図され、したがって、本特許の範囲内である。医学の従事者は、小用量を処方し、被験者の症状に及ぼす作用を観察することを知っている。その後、彼/彼女は、適切な場合には、用量を増大し得る。概して、活性作用物質は、好ましくは、いかなる過度の有害なまたは有毒な副作用を引き起こすことなく、

有効な結果をもたらす濃度で投与され、そして、1回単位用量として、または所望により1日に適切な回数で投与される便利なサブユニットで投与し得る。

【0036】

ナトリウムポンプの機能不全に関連した心臓疾患、例えばうっ血性心不全、心房細動、不整脈等の治療も、予防的または治療的有効量の作用物質を用いて試み得る。本発明の治療は、うっ血性心不全の治療に特に役立つ。

本発明の因子は、異常レベルのナトリウムポンプ活性に関連した種々の疾患及び症状を予防的または治療的に処置するために適用し得る。一例は、長期間の高血圧の症状及び結果を軽減するために予防的または治療的有効量の因子を投与することによる高血圧症の処置である。本特許の方法は、種々の種類の高血圧症、例えば本態性高血圧症、甲状腺機能亢進症誘導性高血圧症及び妊娠誘導性または妊娠関連高血圧症を治療するのに適している。

【0037】

白内障も、予防的または治療的抗白内障有効量の抗体により治療可能である。処置は、白内障の進行を遅らせ、高齢者における白内障を防止し、または白内障手術後の再発を回避するために適用し得る。本因子の用量は、典型的には、医者が知っているように、各患者及び各患者の眼に対して個別に算定される。

作用物質は、予防的または治療的有効量のDh-OLFの投与により、特に男性における性機能不全を治療するのにも適している。

【0038】

本作用物質は、アルツハイマー病を遅延及び治療するためにも活性であり、白内障及び高血圧の場合と同様に、それは、疾患の初期徴候で予防的形態で投与される場合、最も有効である。

【0039】

さらに一般的には、本発明の方法は、予防的または治療的因子上昇有効量のDh-OLFまたはOLFの投与により、Dh-OLF及びOLFのin vivoレベルを増大するために適用可能である。前記のように、in vivoでの2つの相互転換のために、各々が互いに対してプロドラッグとして作用する。例えば、Dh-OLFは、in vivoでOLFに転換され、この作用物質はナトリウムポンプを抑

制するためのより大きい効力を有する。したがって、その作用のあるものは直接作用により得られ、残りはOLFへのその転換により得られ、これが作用物質により大きい効力を提供する。

【0040】

OLF及びDh-OLFの低下が望ましい場合、哺乳類Dh-OLFに対する親和性を有する抗体が発現され、Fv断片が作られる。これらの抗体または断片は、Dh-OLFと選択的に結合するが、しかしOLFとは結合せず、さらに好ましくは、それらはDh-OLFに対する特異性を有し得るが、しかし実質的にはOLFまたは植物由来ウアベインに対する親和性を欠く。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体の形態で存在するが、これは、ウサギのような動物へのDh-OLFの投与により生じ、当業界で既知の方法により単離される。これらの発明者により見出された交差反応性のために、Dh-OLFに対する抗体は、植物dho、dhoA、dhoBまたは脱グリコシル化類似体をウサギのような動物に投与することにより生じさせ得る。別の態様では、抗体はモノクローナル抗体であり、これは、例えば当業界で周知の方法により得られる。Fv断片は、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体から作製し得る。モノクローナル及びポリクローナル抗体、あるいはその断片または合成類似体は、当業界で既知である。抗Dh-OLF抗体は、典型的には被験者におけるOLFまたはDh-OLFのレベル、並びにこれらのレベルの低減が望ましい程度を基礎にした投与量で投与される。一般的範囲は、1 mg~2 gm、さらに好ましくは10 mg~1.5 gm、さらに好ましくは15~800 mg/被験者の体重kgである。

【0041】

標準としてのDh-OLFまたは植物由来ジヒドロウアベイン(dhoB)異性体、抗Dh-OLF抗体または抗dho抗体、並びに抗体Fc結合剤及び試料中のDh-OLFの存在を確定する場合の標識を有するキットの使用のための使用説明書を含む診断キットも本発明者により提供される。診断キットは、任意に抗体Fc結合剤、標識及び標識を抗Fc抗体と操作可能的に連結するための使用説明書を含有し得る。あるいは、利用される標識が限定半減期を有する場合、それは最終使用時点で購入し得る。本発明とともに用いるための抗体Fc結合剤は

、中でも、抗Fc抗体またはその結合断片、プロテインAまたはプロテインCであり得る。本発明の作用物質とともに用いるための標識は、中でも、当業界で既知の任意の検出可能な標識、例えば放射性、蛍光、燐光または生物発光標識、あるいは酵素-基質組合せであり得る。キットは、in vitro検定を実行するための1つまたは多数の固体支持体単位、並びに基質バックグラウンド低下コーティング物質とともに提供し得る。

【0042】

Dh-OLF分析物を含有することが疑われる動物試料中の本発明のDh-OLFの存在は、被験試料を、試料中に存在するあらゆる分析物と抗体が結合するのに有効な条件下で、Dh-OLFに対する、または植物由来ジヒドロウアベイン(dho)異性体混合物に対する特異性を有するが、しかしOLFまたはウアベインに対する特異性を有しない固体支持体結合抗体と接触させ、抗体-分析物複合体(単数または複数)を生成させ、あらゆる基質結合分析物-抗体複合体(単数または複数)と結合するのに有効な条件下で、基質結合抗体-分析物複合体(単数または複数)を標識化抗体Fc-結合剤と接触させて、固体支持体結合分析物-抗Dh-OLF抗体-抗体Fc-結合剤または分析物-抗dho異性体混合物抗体-抗体Fc結合剤標識化複合体(単数または複数)を生成させて、固体支持体-結合標識の量を検出することにより、定性的に確定し得る。

【0043】

利用される抗体は、抗Dh-OLF、抗dho抗体、または両方の混合物であり、各々はポリクローナル混合物またはモノクローナル抗体であり得る。これらは、当業界で既知のように、そして前記を参照して得られる。本方法はさらに、同一または類似条件下での、被験試料のために得られた標識化複合体(単数または複数)の量対既知量の標準、例えばDh-OLFまたは植物由来ジヒドロウアベイン(dho)異性体混合物に関して得られた複合体(単数または複数)の量の比較を含む。これは、例えば、同一または類似条件下で、分析物に関して得られた標識化複合体の量を1以上の既知量の標準Dh-OLFまたはdho混合物に関して得られた標識化複合体(単数または複数)の量と比較することにより、もたらされる。一態様では、既知量の標準Dh-OLFまたはdho混合物は、

標準 Dh - O L F または d h o 混合物を用いて、または用いずに得られた標識化複合体（単数または複数）の量を測定する前に、被験試料に付加し得る。しかしながら、その他の検定法、例えば定量的 H P L C も適切である。

【 0 0 4 4 】

本特許の方法は、任意の体液及び組織、例えば血液、血清、脳脊髄液（C S F）、唾液、胸膜液または滑液及び骨髄の試料を用いて適切に実行し得る。被験試料が例えば血液である場合、血清を残りの試料から分離する必要がある。典型的には、この種類の検定のために利用される標識はすべて、適切である。例としては、放射性、蛍光、燐光及び生物発光標識、並びに酵素 - 基質及び当業界で既知のその他の組合せが挙げられる。一態様では、標識は、リンカーを介して抗体 F c 結合剤と操作可能的に連結させ得る。しかしながら、標識は、別々に投与されるが、しかし抗体と結合する F c 結合剤とも連結させ得る。一般的に、分析物及び標準分子との抗体の結合は、予定時間中に進行され、次に停止される。D h - O L F または d h o 結合抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体であり、好ましくは O L F 及びウアベインと結合できない。

【 0 0 4 5 】

本発明は、予防的または治療的有効量の抗体またはその断片または合成類似体の投与による腎機能損傷を蒙った患者のための治療も提供する。本発明の治療は、腎損傷が存続するかまたは腎不全が大いにあり得る症例において、長期間継続させ得る。さらに一般的には、本発明の方法は、D h - O L F または O L F 器官分泌低減有効量の本発明の抗体を治療を要する被験者に投与することにより D h - O L F または O L F の器官分泌の低減のために適用可能である。本発明の抗体、キメラ抗体及びヒト化抗体は、実質的に強くない正常組織との結合を示す。ウサギ及びネズミ抗体は、キメラポリペプチド及びヒト化抗体の場合と同様のパターンを示す。好ましい一態様では、本発明の抗体は標識される。

【 0 0 4 6 】

本発明を一般的に説明してきたが、本発明は、いくつかの特定の実施例を参照することによりより良好に理解される。これらの実施例は説明のためにのみ、本明細書中に含まれており、別記しない限り、本発明を、またはそのいかなる実施

態様も限定するものではない。

【0047】

実施例

実施例1：化学物質及び試薬

用いられた化学物質はすべて、試薬等級であった。5 - スルホサリチル酸 (S S A)、炭酸カルシウム (CaCO_3)、ジゴキシン、ウアベイン、ウアバゲニン、ジヒドロウアベイン、ブタ大脳皮質 Na^+ 、 K^+ - A T P アーゼ (P C C)、ナトリウムポンプの触媒的抑制のための全試薬 (アデノシン 5' - トリホスフェート (A T P)、モリブデン酸アンモニウム、トウイーン 80、ウシ血清アルブミン (B S A)、並びにゲル電気泳動のための全試薬、例えばアクリルアミド、ビス - アクリルアミド、N, N, N', N' - テトラメチルエチレンジアミン (T E M E D)、トリス [ヒドロキシメチル] アミノメタン (T R I Z M A 塩基)、ドデシル硫酸ナトリウム (S D S)、グリシン、 γ -メルカプトエタノール、プロモフェノール染料) を、Sigma (ミズーリ州、セントルイス) から入手した (但し、Amresco (オハイオ州、ソロン) から購入した過硫酸アンモニウムを除く)。ジゴキシゲニン及びジヒドロジゴキシンは、Burroughs Wellcome Co. (ノースカロライナ州、リサーチ・トライアングル・パーク) から寄贈された。予備染色タンパク質マーカーは、Bio-Rad (カリフォルニア州、リッチモンド) から購入した。リン - 32 - ホスフェート (^{32}P i、100 μL 中に1 mCi) は、NEN, Life Science Products (マサセッチュセッツ州、ボストン) から購入した。硫酸 (H_2SO_4) 及び塩酸 (H C l) は、Fisher (ニュージャージー州、フェアローン) から入手した。アセトニトリル (CH_3CN) 及び過塩素酸 (HClO_4) はともに、クロマトグラフィー等級であり、Aldrich Co. (ワイオミング州、ミルウォーキー) から入手した。T M B 可溶性試薬及び T M P 停止緩衝剤は、SKYTEK Laboratories (ユタ州、ローガン) から購入した。脱イオン水 (dH_2O) は、生物学的物質のすべての操作に用いた。

【0048】

実施例2：装置及び材料

ポリトロン P T 3000 (Brinkman、ニューヨーク州、ウェストバリ) は、副腎皮

質組織を均質化するために、そしてオリオン pH / SEメーターモデル710A (Orion、マサチューセッツ州、ケンブリッジ) は pH 測定のために用いた。固相抽出 C - 18 カートリッジ (Sep-Pak) は、Waters Associates (マサチューセッツ州、ミルフォード) から入手した。HPLC は、Waters 600E システムコントローラー及び Waters 966 フォトダイオードアレイ検出器に接続された C - 18 逆相 μ Bondapak カラム (3.9 X 300mm, 粒子サイズ 10- μ m) 上で実施した。溶離分画は、Waters 分画収集器 (Millipore Corp.、マサチューセッツ州、ミルフォード) で収集し、Jouan Refrigerated Trap RCT 60 (バージニア州、ウィンチェスター) に接続された Jouan Centrifugal Vacuum Concentrator RC 10.22 で蒸発させた。UV - 分光測光のために、Hewlett-Packard (カリフォルニア州、パロアルト) モデル 8452A ダイオードアレイ分光高度計を、我々は用いた。Beckman JA-2 遠心器 (Beckman、カリフォルニア州、パロアルト) は、組織調製手法における遠心分離のために用いた。ナトリウムポンプ抑制検定のために、Corning (ニューヨーク州、コーニング) から購入した使い捨て非滅菌 96 ウェル平底ポリスチレンマイクロタイタープレートを用い、そして DuPont マイクロプレート読取機 II、Multiskan MCC/340 (デラウェア州、ウィルミントン) で 340 nm で発色を測定した。

【0049】

Upstate Biotechnology Inc. (UBI、ニューヨーク州、レークプラシッド) から購入したモノクローナルマウス抗ウサギ NKA アイソフォーム特異的抗体は、ウエスタンブロット用に用いた。ヤギ抗マウスホースラディッシュペルオキシダーゼ接合体抗体は、Bio-Rad (Hercules, CA) から購入し、ウエスタン分析によるナトリウムポンプアイソフォーム及び酵素免疫検定 (EIA) による dho の両方の検出における第二抗体として用いた。

【0050】

ゲル電気泳動は、当該タンパク質を分解するために適用し、Hoefer Scientific Instruments (モデル SE 245、SE 260 及び SE 400、カリフォルニア州、サンフランシスコ) からのミニゲル及び垂直スラブゲル電気泳動ユニットの両方で実施した。酸性ゲルは、Savant ゲルポンプ (GP 100) (ニューヨーク州、ファーマンデール) に接続されたスラブゲル乾燥機 (SDG 4050) で乾燥した。³²Pi - 放

射能標識帯域の濃度測定は、Personal Laser濃度計SI (Molecular Dynamics、カリフォルニア州、サニベール) で実施した。交差反応試験のために、NEN Research Products (マサチューセッツ州、ボストン) からウアベインEIA試薬キットを購入した。

【0051】

実施例3：組織調製

ウシ副腎は、Pel-Freeze Biologicals (アーカンサス州、ロジャース) から入手するか、または地方の屠殺場から提供された。皮質を髓質から分離し、薄片にして、刻み、Polytron PT 3000ホモジナイザーを用いて2 ml d H₂O/g皮質中で均質化した。ホモジネートを34,000gで4 で30分間、3回遠心分離し、その後、各遠心分離工程のペレットをd H₂O (1 ml/皮質 g) 中に再懸濁させた。上清を1% S S Aとともに室温で60秒間、連続攪拌しながらインキュベートし、その直後に、pHが増大し、5.2を維持するまで、過剰量のC a C O₃を添加することにより、組織ホモジネート中のタンパク質を沈澱させた。次に、この抽出物を80,000 xgで4 で10分間遠心分離し、その後、2層のWhatman# 1濾紙を用いて真空濾過した。初期精製は、固相抽出により実施した。C - 18逆相固相Sep-Pak抽出カートリッジ (Vac 10 cc) を1容積のC H₃C Nでプライムし、その後、2容積の脱イオン水d H₂Oですすいだ。上清を投入し、1 ml/分の速度でカートリッジに2回通した。次にカートリッジを2~4容積のd H₂O (典型的には20~30 ml) で2回洗浄した後、当該化合物をのd H₂O中の10% C H₃C N 20 mlで溶離した。C H₃C Nを除去するために、溶離物を真空デシケーター中で蒸発、乾燥させ、d H₂O中で再構成させて、粒子の除去のためにWhatman (ニュージャージー州、クリフトン) からの0.22 μ フィルターに通した。

【0052】

実施例4：HPLC逆相クロマトグラフィー

第一クロマトグラフィー工程では、再構成Sep-Pak溶離物を、30分間、20~80%の線状C H₃C N : H₂O勾配を用いた高圧液体クロマトグラフィー (HPLC) により分別した (1 ml分画/分を40分間収集した)。典型的には、約6分で溶離する当該分画を収集し、蒸発させて、1 mlのd H₂O中で再構成させて、ジゴ

キシニン - R I A またはウアベイン E I A により測定した後、任意のさらなる分析を実施した。当該化合物の適正な分離を保証するために、前の抽出工程からの溶離物がすべて分析されるまで、これらの工程を反復した。第二クロマトグラフィー工程では、均等様式の水中の10% CH_3CN を用いてウアベイン及びその2つのコンジェナー（ウアバゲニン及びジヒドロウアベイン）を互いから分離した。O L F 及びそのコンジェナーを分離するために、第一クロマトグラフィー工程から6分で溶離する分画を、40分間、均等様式の10% CH_3CN の同様の移動相を用いて、さらにクロマトグラフィー処理した。分画（1 ml / 1分）を収集し、蒸発させて、 dH_2O 中で再構成させて、ウアベイン E I A 及び UV 分光測光法により、220及び196 nm で測定した。19、24.5、27.5及び30.5分で溶離する分画を、さらに精製するために同一の均等様式で再クロマトグラフィー処理した。これらの精製分画を、O L F 及び D h - O L F に関してそれぞれウアベイン E I A 及びジヒドロウアベイン E I A により再び分析し、196及び220 nm での吸光度を測定した。測定された UV 吸光度及びそれら（ウアベイン及び / またはジヒドロウアベイン）の免疫反応性等価濃度を用いて、O L F 及びその関連コンジェナーの最終収量を確定した。

【0053】

実施例5：ヒト血清 O L F 並びにそのジヒドロ - 及び脱グリコシル化コンジェナー

ジゴキシニン不含新鮮凍結ヒト血漿を American Red Cross（ケンタッキー州、ルイスビル）から入手した。S S A で処理されていない血清試料に関しては、全1 ml 試料を Sep-Pak カートリッジに適用した。いずれの場合も、 CH_3CN を除去するために、溶離物を蒸発乾燥させて、残渣を1 ml の dH_2O 中に溶解して、H P L C の用意に、Whatman 0.22 μm フッ化ポリビニリデンフィルター（P V D F）に通して溶液を濾過した。

【0054】

実施例6：O L F 及び D h - O L F のモル吸収率及び濃度

これらの内因性因子の UV スペクトル特性、モル吸収率及び濃度を算定した。それらの個々の最大吸光波長では、O L F 及び D h - O L F のモル吸収率はそれ

ぞれウアベイン及びジヒドロウアベイン (d h o - B) に匹敵すると思われた。ウアベイン酵素免疫検定 (E I A) またはジヒドロウアベイン E I A によりそれぞれ得られた O L F 及び D h - O L F のパーセンテージ交差反応性を用いて、両分子の見掛けのモル免疫反応性濃度を確定した。O L F 及びそれらのそれぞれの抗体を有するコンジュナーのパーセント交差反応性を、これらのデータから得た。

【 0 0 5 5 】

実施例 7 : O L F 及び D h - O L F の免疫反応性測定

ウアベイン E I A を用いて、O L F を測定した。この検定は、一定量の抗ウアベイン抗体との結合に関して非結合試料または標準と競合するようマイクロタイタープレートに共有結合されたウアベインを用いる (Harris et al. , 1991) 。 H T I Bio-Product Inc (カリフォルニア州、ラモナ) により我々の明細書にしたがって調製されたポリクローナルジヒドロウアベイン特異的抗体を用いた E I A により、ジヒドロウアベイン様免疫反応性を測定した。抗体産生戦略を以下に示す : ジヒドロウアベイン (d h o) を、ラムノース糖環を介してキーホールリムペットヘモシアニン (K L H) と接合させ、その結果生じた接合体を 3 匹のウサギに注射した。一次注射後 3 週間目に、その後の追加免疫注射後 2 週間毎に、ウサギから血液試料を採取した。

【 0 0 5 6 】

過硫酸アンモニウム沈澱とその後のリン酸塩緩衝生理食塩水により、免疫グロブリンをさらに精製した。E I A 検定は、結合 d h o と遊離 (非結合) d h o の、または試料と一定量の d h o 抗体との競合的結合を基礎にした。マイクロタイターウエル中のジヒドロウアベインまたは試料の存在は、d h o 被覆化マイクロタイターウエルに結合する d h o 抗体の低減を生じる。これは、結果的に、結合する第二抗体 (ヤギ抗ウサギホースラディッシュペルオキシダーゼ接合体) の低減を生じ、したがって接合した酵素による基質の分解から得られたシグナルの低減を生じた。したがって、シグナル強度は、ウエル中の d h o または D h - O L F の量に反比例する。

【 0 0 5 7 】

要するに、イムノアッセイプレート(4)で最低18時間、約0.5 µgのd h o - B S A接合体/ウエルで被覆した。プレートをP B S中の0.05%トゥーン20(洗浄溶液)で洗浄し、次にP B S中の10 g/lのB S A溶液(阻止溶液)で、37で2時間阻止した。洗浄後、標準及び試料(50 µl/ウエル)を先ず添加し、その後d h o - 抗体(50 µl)を添加して、プレートを室温でインキュベートした。2時間後、プレートを4回洗浄し、かすかにプロットさせて、100 µlの第二抗体(ヤギ抗ウサギホースラディッシュペルオキシダーゼ接合体)を添加し、室温でさらに2時間、d h o - 抗体と結合させた。最後に、プレートを3回洗浄して、100 µlの基質T M B可溶性試薬を各ウエルに添加した。650 nmで最大30分間、発色をモニタリングし、その後、T M B停止緩衝液で反応を停止させ、次にプレートを450 nmで読み取った。読取りは、システムブランクを用いて、非特異的結合に関して調整した。

【0058】

実施例8：Na⁺、K⁺ - A T Pアーゼ活性の抑制(ナトリウムポンプの抑制)
本検定を用いて、小容量用の方法の感度を増大するために小修正を加えたChanとSwaminathan(1992)の方法を基礎にしたA T Pの加水分解時のリン酸塩放出に及ぼす哺乳類O L F及びそのコンジェナーの作用を測定した。ブタ大脳皮質組織(P C C)の乾燥凍結粉末を、50 mMトリス - H C l及び2 mM M g C l₂、p H 7.2を含有する緩衝液中で1単位/mlで再構成した。次に、再構成組織を3回洗浄し、同一緩衝液中に再懸濁した。約1 mg/mlに調整したBIO-RADタンパク質検定(Bio-Rad、カリフォルニア州、ハーキュレス)によりタンパク質濃度を確定し、触媒的抑制及びウアベイン刺激性リン酸化実験(P A G E及びウエスタン分析)の両方に用いた。所望濃度の配糖体(非阻害剤対照用にはトリス緩衝液を用いた)を含有する20 µlの試料を、10分間、37 水浴中に置いたマイクロタイタープレートのウエル中にピペット分取することにより、抑制検定を簡単に実施した。

【0059】

Na⁺、K⁺ - A T Pアーゼの - サブユニット(すべてアイソフォーム)の供給源として、トリス緩衝液、p H 7.8中に希釈したブタ大脳皮質Na⁺、K⁺ - A T Pアーゼ溶液(1 mg/ml) 20 µlを添加し、さらに20分間インキュベートさせた

。20 μ lのATP溶液(トリス緩衝液pH7.8中に10 mM)を添加し、さらに15分間反応させた。混合物の最終濃度を以下に示す: トリス - HCl 133.3 mmol/l、pH7.8緩衝液中にカリウム3.3 mmol/l、ナトリウム133.3 mmol/l、マグネシウム3.3 mmol/l及びATP 3.3 mmol/l。インキュベーション期間後、150 μ lのモリブデン酸塩溶液(1リットル当たり、1.0 mmolのモリブデン酸塩、11 mmolの硫酸及び142 mlのトウイーン80:メタノール溶液(容積比12:88))を添加した。30分間のインキュベーション後、最大30分間、発色を進行させて、その後、各ウエルから150 μ lの反応混合物を別のマイクロタイタープレート上の対応するウエルにピペット分取して、色強度を測定した。色強度は、ATP分解の、したがってNKA活性の直接指標であるリン酸塩イオンの放出に比例した。同時に340 nmで吸光度を測定した。Na⁺、K⁺ - ATPアーゼ活性抑制の%は、配糖体によるウアベイン抑制活性を表す。

【0060】

実施例9:統計分析

試料はすべて、3~4回検定した。反復実験試料は、バックグラウンド(検定緩衝液のみ)に対して修正し、ウアベイン感受性Na⁺、K⁺ - ATPアーゼ活性(1 mMウアベインで100%抑制)に対して平均化し、正規化した。各値は、実施した試料検定の数の平均 \pm 標準偏差を表す。各化合物のNa⁺、K⁺ - ATPアーゼの%は、その化合物により抑制可能であるウアベインの割合を表す。50%抑制(IC₅₀)に要する阻害剤の濃度を確定するためのロジット回帰曲線による最良適合を含めた統計分析を、ウインドウズ先進統計プログラムバージョン7.5(SPS S、イリノイ州、シカゴ)のためのSPSSで実施した。

【0061】

実施例10:ナトリウムポンプの α -アイソフォームの位置決定

3つの α -アイソフォームに対するNKAアイソフォーム特異的抗体(UBI、ニューヨーク州、レークプラシッド)を利用することによって、ウエスタンブロット分析によりゲル上のナトリウムポンプ(Na⁺、K⁺ - ATPアーゼ) α -アイソフォームの位置を決定した。乾燥ゲル上の予備染色分子サイズマーカーに対するX線フィルム上の帯域の位置を一行に並べることにより、これらの種の各々

の位置を確定した(未発表データ)。Laemmli法により、SDS-PAGEを実施した。要するに、タンパク質試料を負荷緩衝液(250 mMトリス-HCl、pH 6.8、10% SDS、3% β -メルカプトエタノール、50%グリセロール、0.01%ブロモフェニルブルー)中で5倍に希釈し、65℃に5分間加熱した後、7.5~12.5% SDS-PAGEゲル上に2回載せた。ミニゲルSE260ユニット(Hoefer Scientific Instruments、カリフォルニア州、サンフランシスコ)で、電気泳動を実行した。各々ネガティブ対照及び予備染色分子サイズマーカー(BioRad、カリフォルニア州、ハーキュレス)を含むSDS-PAGEゲル反復実験を実行した。1つのゲルをブロモフェニルブルーで染色して、分離帯域を可視化し、他のゲルは、TE42 Transphor電気泳動ユニット(Hoefer Scientific Instruments、カリフォルニア州、サンフランシスコ)により、0.45 μ ナイロン膜(MSI、マサチューセッツ州、ウェストボロ)に電気泳動的に移した。プロットしたタンパク質を、モノクローナル抗Na⁺、K⁺-ATPアーゼ α -1、 α -2及び α -3サブユニット抗体(UBI、ニューヨーク州、レークプラシッド)を用いて1時間プローブした。プロット上の各アイソフォームの位置を、ホースラディッシュペルオキシダーゼ接合ヤギ抗マウス抗体を用いて可視化して、メーカーの指示通りに化学蛍光によりオートラジオグラムでシグナルを検出した(Amersham Life Sciences、英国、バッキンガムシャー)。

【0062】

実施例11：Na⁺、K⁺-ATPアーゼのウアベイン刺激³²P iリン酸化

リン酸塩によるNa⁺、K⁺-ATPアーゼのウアベイン刺激リン酸化を、Huang等(1994)に記載されたのと同様に、いくつかの小修正を加えて、実施した。無機リン(³²P i)から生成されるナトリウムポンプの共有的リン酸化中間物質はアルカリ不安定性(酸安定性ホスホ酵素中間物質)であるため、酸性pHゲル電気泳動を用いて、放射能標識化タンパク質種を分解した。要するに、100~200 μ gのブタ大脳皮質組織(PCC)を含有する60 μ lのアリコート室温で25分間、20 μ lの試料とともに反応緩衝液(50 mMトリス-HCl及び2 mM MgCl₂、pH 7.2)中で予備インキュベートした。ポジティブ対照を1 mMのウアベイン溶液20 μ lとともに予備インキュベートし、さらにネガティブ対照を、20 μ lの緩衝

液単独とともに予備インキュベートした。10 μ lの 32 P i (100 μ l中に1 mCi) を250 μ lのリン酸で稀釈し、0.2 μ mフィルターを通して精製して、ポリホスフェートを除去した。

【0063】

インキュベーション終了時に、20 μ lの 32 P i 濾液 (30 μ M、8 uCi) を混合物に添加して、室温でさらに15分間インキュベートさせた。1 mlの8% H C L O₄ 添加により反応を終結させ、これによりタンパク質が沈澱し、溶液中に取込まれなかった 32 P i が残った。次に試料をすぐにペレット化して、最終濃度0.5容量%のH C L O₄、2.5重量%のS D S、10容量%のグリセロール及び0.1質量%のピノミンY染料を含有する試料緩衝液中に再懸濁させた。試料 (100 μ l) を12%酸性ポリアクリルアミドゲル上に載せて、4 で4~5時間、30 mAの一定電流で走行させた。ゲルを40%メタノール、10%酢酸中に固定し、乾燥して、オートラジオグラフィー処理した。ソフトレーザー走査濃度計を用いて、オートラジオグラムを量的に表した。

【0064】

実施例12：ジヒドロ - O L F (D h - O L F) の発見及び単離

以前の報告において、本発明者等は、一つのクロマトグラフィー溶離におけるD L I F及びO L Fのいくつかのコンジェナーの単離のための技法を実証した (Qazzaz et al., 1996a)。その手法を用いて、O L Fは、溶離プロフィールにおいて初期に移動し、即ち6分で分別された。O L F分画はさらに、ここでは、水中の均等様式の10% C H₃ C Nを用いて、6分で特性化した。これらの条件下で、4つの十分に分解されたクロマトグラフィーピークが分解したが、これは、ウアベイン (30分で)、ウアバゲニン (20分で)、及び24.5及び27.5分で溶離するジヒドロウアベインの2つの異性体 (d h o - A及びd h o - B) に対応する。副腎皮質組織から6分で溶離した内因性O L F分画を、3つのコンジェナー (1つは以前にO L F - ゲニンと同定されている)、及びジヒドロウアベインと類似の特性を有する新規の種 (本明細書中ではD h - O L Fと呼ぶ) にさらに分離した。分画27.5で本明細書中で単離されたD h - O L Fは、標準ジヒドロウアベイン構成成分d h o - Bと同一のクロマトグラフィー保持時間を示した。O L Fのこ

の新規の種は、ヒト血清の単離物中にも見出された。全症例において、ウアベイン及びジヒドロウアベイン抗体の両方に対する免疫反応性及び196 nmでの吸光度を用いて、溶離プロフィールをモニタリングした。

【0065】

実施例13：Dh-OLF及びOLFのスペクトル分析及び濃度

Dh-OLF及びOLFのUVスペクトルは、ジヒドロウアベイン（196 nmで最大）及びウアベイン（222で最大）と同様である。196 nm_{max} Dh-OLFは、ともに水素添加ラクトン環の特徴である遠UVシフト及び低吸収率を含めた前記で示したような化学的還元（水素添加）ラクトン環の存在と一致する。2つのOLF種であるOLF及びDh-OLFの絶対及び相対濃度を概算するために、植物関連化合物であるウアベイン及びジヒドロウアベイン（構成成分dho-B）のものと同一のモル吸収率をそれぞれ想定した。Dh-OLF及びOLF間で同様の抽出効率を想定した場合、以下の量及び相対濃度のDh-OLF及びOLFが、ウシ副腎皮質組織中及びヒト血清中に見出された（以下の表1参照）。

【0066】

【表1】

表1：ウシの副腎皮質及びヒトの血漿におけるOLF及びDh-OLFの量

内因性因子	ヒトの血清 (モル×10 ⁻¹⁰ / l 血清)	副腎皮質 (モル×10 ⁻¹⁰ / gm皮質)
OLF	3.8±0.42 (n=4)	0.017±0.003 (n=5)
Dh-OLF	50±4.6 (n=5)	0.360±0.034 (n=5)

ウアベインとOLF及びジヒドロウアベイン (dho-B) とDh-OLFの間に同様なモル吸光率を呈した。
副腎皮質及びヒト血清中のOLFに対するDh-OLFの比率はそれぞれ、22及び13である。
各値は、実施した組織抽出数の平均±標準偏差を示す。

【0067】

実施例14：Dh-OLF及びOLFの免疫反応性

1つはウアベインに対するそしてもう一つはジヒドロウアベインに対する2つの特異的抗体を用いて、OLF及びDh-OLFを特性化した。これらの抗体はともに、これらの分子のラクトン環エピトープでの構造的変化に感受性である。ウアベイン抗体は、ジヒドロウアベインとの2~3%交差反応性を示したが、一方、ジヒドロウアベイン抗体は、ウアベインと0.1%の交差反応性を示した。OLF及びDh-OLFは、それぞれウアベイン抗体及びジヒドロウアベイン抗体との反応性における単一応答を示した。50%応答を用いて、図3に示したように、それらの免疫反応性能力を比較した。下記のようにモル吸収率を用いて、濃度を確定した。

【0068】

実施例15：Dh-OLF及びOLFのNa⁺、K⁺-ATPアーゼ抑制能力

ウアベイン及び標準異性体dho-Bによる、並びにOLF及びDh-OLFによるNa⁺、K⁺-ATPアーゼ触媒活性の(3つのアイソフォームを含有す

るブタ大脳皮質)抑制に関する相対能力を比較した。ウアベイン及びOLF間の、そしてジヒドロウアベイン(dho-B)及びDh-OLF間の匹敵するモル吸収率を仮定することにより、OLF及びDh-OLFの両方の濃度を確定した。OLFはウアベインの12倍の効力を有したが、一方、Dh-OLFはジヒドロウアベイン構成成分B(dho-B)の3倍の効力であった。抑制活性の順序は、OLFがDh-OLFより有効であるのとちょうど同様に、ウアベインはジヒドロウアベインより効力が大きいことを示す。哺乳類由来因子の応答曲線は、植物関連の相対物の曲線とは平行しなかったが、このことは、アイソフォーム、組織及び期間特異性によるそれらの結合における考え得る差異を示す。さらに、Dh-OLF及びその植物関連の相対物であるdho-Bは、OLF及びウアベインより急勾配の応答曲線を有し、このことは、還元ラクトン環を有する化合物に対応する酸化種を有する化合物の異なる結合親和性を示す。

【0069】

実施例16：Dh-OLF及びOLFによる Na^+ 、 K^+ -ATPアーゼのリン酸化

Na^+ 、 K^+ -ATPアーゼ サブユニットのウアベイン刺激 $^{32}\text{P i}$ -リン酸化は、サブユニット上の特異的結合部位とのウアベインの結合に依存していることが示されている。このリン酸化は、ATP加水分解中にATPによりリン酸化される Na^+ 、 K^+ -ATPアーゼのサブユニットの同一アスパルチルアミノ酸中に P i を共有的に組み入れる。ウシ副腎皮質組織及びヒト血清から単離された哺乳類由来のOLF及びDh-OLFにより、サブユニットのリン酸化を誘導した。さらに、サブユニット中への $^{32}\text{P i}$ の組入れは、OLF及びDh-OLFにより刺激した場合、これらの因子の濃度に依存していることが示された。リン酸化に要するDh-OLFの濃度は、触媒的抑制に要する Na^+ 、 K^+ -ATPアーゼの濃度範囲と平行であった。ウアベインまたはその他の植物由来及び内因性ポンプ阻害剤によるナトリウムポンプの抑制を、ATP分解の低減に換算した。しかしながら、その他の抑制検定は典型的には Ca^{2+} -ATPアーゼのような組織中のその他のATPアーゼの妨害により影響されるが、一方、ウアベイン刺激リン酸化は、 Na^+ 、 K^+ -ATPアーゼに特異的である。dhoは、実際、等

モル濃度のウアベインと同様のナトリウムポンプのウアベイン感受性リン酸化を刺激する場合の効力の82%である。

【0070】

実施例17：実験的知見

新規の分子形態の哺乳類ウアベイン様因子、即ちジヒドロウアベイン様因子 (Dh - O L F) が本発明者等により見出されたので、ここに報告する。この因子は、本発明者等により単離された2つのジヒドロウアベイン (d h o) 異性体のうちの1つである d h o - B との類似性を有する。ウシ副腎皮質及びヒト血漿中の水素添加 (還元型) ラクトン環を有するウアベイン様因子 (Dh - O L F) の存在を、クロマトグラフィー的溶離パターン、吸収スペクトル、ウアベインに特異的な1つとジヒドロウアベインに特異的な1つの合計2つの抗体との結合、抑制 Na^+ 、 K^+ - A T P アーゼ触媒活性並びに Na^+ 、 K^+ - A T P アーゼ サブユニットのウアベイン刺激リン酸化により実証した。

【0071】

ウシ副腎皮質及びヒト血漿からの内因性対である O L F 及び Dh - O L F の H P L C パターン (オーダー及び時間) は、それらのそれぞれの強心配糖体植物由来相対物であるウアベイン及びジヒドロウアベインのパターンと同様である。植物関連ジヒドロウアベイン (d h o - A 及び d h o - B) の2つの異性体を、本発明者等は近年分離したが、それらは別個の特許に包含されている。O L F 及びその脱グリコシル化コンジェナーは、ウシ副腎及びヒト血漿中に存在するが、一方、1つのジヒドロウアベイン様 (Dh - O L F) 異性体が、これらの組織中に見出された。d h o 特異的抗体を用いて、ウシ副腎及びヒト血漿の両方に存在するジヒドロ種としての Dh - O L F の存在を確証し、特性化した。両組織からの内因性哺乳類 O L F 及び Dh - O L F の u v スペクトルは、それらのそれぞれの相対物であるウアベイン及び d h o - B の場合と同様であるが、但し、ウアベイン及び O L F の λ_{max} は 220 nm であり、一方、d h o 及び Dh - O L F は 196 nm で最大吸光度を有する。Dh - O L F の λ_{max} は、それが、植物由来水素添加誘導体と同様に、還元型ラクトン環を有することを確証するが、この場合、2つの組み入れられた水素は、O L F の二重結合を置換する。この特徴的吸光度ピーク

は、前記の化学式から分かるように、OLF及びその植物由来ウアベインにおいて観察される同一uvシフトと関連する。

【0072】

OLF及びDh-OLFをさらに特性化するために用いられる2つの異なる抗体、即ち抗ウアベイン及び抗ジヒドロウアベイン抗体は、ウアベイン及びジヒドロウアベイン分子のラクトン環に対する修飾に感受性である。したがって、抗ウアベイン抗体はウアベインに対して100%の親和性を有したが、一方、それはジヒドロウアベインまたはDh-OLFに対する親和性をほとんど示さなかった。同様に、抗ジヒドロウアベイン抗体は、ジヒドロウアベイン及びウアベインとOLFに対してそれぞれ100%及び0.1%の親和性を有した。

【0073】

EIAデータは、「ウアベイン様」でないが、「ジヒドロウアベイン様」である別個の免疫反応性ピークを有する化合物の存在を示し、それらの相対溶離位置は、還元型ラクトン環カルデノリドの吸収スペクトル特性とよく相関した。さらに、哺乳類因子OLF及びOLF-ゲニン（後者はウアベイン抗体との結合に関してウアベインとの60%交差反応性を示す）を、2つの別個の免疫反応性ピークとして検出した。これら2つのピークは、それぞれ19及び30分で、脱イオン水移動相中の同一の均等様式の10%CH₃CN上でHPLCから溶離した。これは、Dh-OLFが哺乳類中に存在し、2つのdho異性体のうちの1つ：dho-Bとの類似性を有する、ということを示す。検定した場合、OLF及びDh-OLFは、それぞれ抗ウアベイン及び抗ジヒドロウアベイン抗体との免疫反応性を立証した。

【0074】

表1は、副腎組織中のDh-OLF：OLF比が22であり、ヒト血清中のDh-OLF：OLFが、副腎皮質中に見出された値のほぼ半分の13であることを示す。同様の抽出効率を想定すると、これらのデータは、哺乳類ジヒドロ-ジゴキシン様免疫反応性因子（Dh-DLIF）及びその酸化型種であるジゴキシン様免疫反応性因子（DLIF）に関するこれら2つの因子の存在量を示す。

【0075】

Dh - DLIF 対 DLIF のモル比は、ウシ副腎皮質組織中では約5.3、ヒト血清中では約0.38であることが判明した。これは、副腎皮質組織が、それらのそれぞれの酸化種である DLIF 及びOLF より多い量の水素添加種である Dh - DLIF 及び Dh - OLF を含有することを実証する。しかしながら、本発明の因子である Dh - OLF 対 OLF の比は、副腎皮質組織中では、Dh - DLIF 対 DLIF の比の4.2倍である。これは、ジヒドロ - OLF が副腎中ではOLF の前駆体として作用しており、したがってこれらの腺は、血流中への分泌を要する場合に、OLF の産生の酵素的調節のための水素添加前駆体を依然として高量で利用可能である。この転換工程は、新規の標的薬剤開発を提供する。さらに、血漿中の Dh - OLF 対 OLF の比は、病気経過中に観察されるタンパク質結合の程度の変化を反映する。本発明の観察は、OLF 及び Dh - OLF が異なる哺乳類組織中に異なる量及びモル濃度で存在し、Dh - OLF 対 OLF の最大比は副腎皮質中で観察される、ということを示す。これは、Dh - OLF からのOLF の *in vivo* 産生の代謝調節に関与する還元型及び酸化型の作用物質の比の実際の変動を反映する。それは、OLF 及び Dh - OLF 間の代謝平衡が異なる哺乳類組織中に存在し、平衡は、個体の生理学的及び病理学的状態によって変わる、ということも立証する。

【0076】

したがって、この哺乳類因子の酸化 (OLF) 及び還元 (Dh - OLF) 種は、代謝的、生理学的及び病理学的に連関し、副腎はこれらの因子の富供給源であることが示された。前記ですでに示したように、ウシ副腎皮質から調製されるミクロソームによって、ジヒドロ - ジゴキシンはジゴキシン様免疫反応性物質に転換される。これは、シトクロム P - 450、NADPH 及び NADPH 依存性レダクターゼにより仲介されるラクトン環の酸化によって起こる。

【0077】

OLF 及び Dh - OLF に関して、それらのそれぞれの吸収率最大で、即ちそれぞれ220 nm及び196 nmで、そしてウアベイン及びジヒドロウアベインに関しては、それぞれ220及び196 nmで、等モル吸収率を想定し得る。一次数近似値ではあるが、この仮定を用いて、それぞれの波長でのそれらの吸収値から各哺乳類因

子のモル濃度を概算した。ウアベインまたはジヒドロウアベイン免疫反応性当量当たりの実際のOLFまたはDh-OLFの比は、1 pmol/1 pmolと算定された。即ち、OLF及びDh-OLFの相対モル免疫反応性は、ウアベイン及びジヒドロウアベインの、それらのそれぞれの抗体（抗ウアベイン及び抗ジヒドロウアベイン抗体）に関する免疫反応性と比較した場合、1である。この値をDLIF及びDh-DLIFと比較すると、それらのそれぞれの抗体に関してジゴキシン及びジヒドロジゴキシンの975分の1及び2588分の1の免疫反応性で、これらの相対モル免疫反応性値は、OLF及びDh-OLFが、DLIF及びDh-DLIF対植物由来ジゴキシン及びジヒドロジゴキシンより、それぞれ構造的にそれらの植物関連ウアベイン及びジヒドロウアベインB(dho-B)異性体相対物により多く類似することを示す。

【0078】

RIA、EIA及びRRAのような異なるイムノアッセイにより、ヒト血漿中で測定した場合、ウアベイン様因子(OLF)に関して、広範囲の濃度が認められた。OLFのヒト血漿濃度は、25 pMから、34~95 pMまで、50~750 pMまで、55~168 pMまで、240 pMまでの範囲である。本発明者等により見出されたOLFの濃度は、5 nMで、意外にもすべて従来の報告及びEIA測定により得られたものより高い。

【0079】

データは、OLF及びDh-OLFが生物学的活性を立証することを示す。両方が触媒的ブタ大脳皮質Na⁺、K⁺-ATPアーゼ活性を抑制し、Na⁺、K⁺-ATPアーゼ サブユニットをリン酸化する、ということも示された。OLF及びDh-OLFは、それぞれウアベイン及び2つのジヒドロウアベイン異性体の1つ(dho-B)より10倍及び3倍高い効力を有することが判明した。哺乳類Dh-OLF及び植物由来dho-B異性体は、しかしながら、それぞれ、それらの酸化種(OLF及びウアベイン)の10分の1及び3分の1の効力を示した。その比の差は、両哺乳類因子がそれらの植物由来相対物よりはるかに高い効力を有することを明らかに示している。

【0080】

したがって、ここに提示された結果は、Dh-OLFが、哺乳類組織におけるナトリウムポンプの触媒的活性を調節する場合に一役を有する、ということを示す。さらに、天然哺乳類Dh-OLFは、酸化種(OLF)と比較して、抑制効力低減を有することが示された。この作用は、Dh-OLF中の還元型ラクトン環の存在によるものと思われる。

【0081】

実施例18：ジヒドロアベインの2つの異性体の精製及び特性化

実施例4に記載したように、HPLCにより、ジヒドロアベインの市販試料を分離した。2つの精製ジヒドロアベイン異性体の各々を、重水素添加メタノール(CD_3OD)中に溶解し、NMR試料管(Wilmad 327-PP)に移した。ナロラック3 mm Z-SpecMDBプローブで、予備的 1H 及び ^{13}C データを得た。標準Brukerパルス配列を用いた5 mm BB-逆プローブで、3mm試料管を用いて、二次元NMR実験($^1H-^1HCOSY$ 、 $^1H-^{13}CHMQC$ 、HMBC)を実施した。

【0082】

陽性イオンESI⁺質量スペクトルにより得られた質量スペクトル観察(断片化パターン及び相対イオン存在量)は、ジヒドロアベインの2つの構成成分が分子異性体であることを示す。 m/z (質量/電荷比)587.1で観察された単一の独自ピーク(活性物質の主要イオン)は、3つのスペクトルのすべてにおいて、陽子化イオン $[M+H^+]$ と同定された。この比は、ジヒドロアベインに関して予測されたものと同じの整数質量586.7 Daの物質の陽子化イオンに対応する。同様に、 m/z 147及び85で観察された同一シグナルは、それぞれdhoの糖部分及びラクトン環と同定される。全体的に、2つの精製異性体化合物は、互いに、並びにdhoストックと同一の断片化パターンを示した。両化合物は、($C_{20}H_{46}O_{12}$)の元素組成を有する。両化合物の理論的に正確な質量は、ESI質量分光法により確定した場合、587.8 Daである。

【0083】

dhoの2つのHPLC精製異性体は、化学シフト及びシグナル強度の両方で、初期同一陽子 1HNMR スペクトルを示した。2つの異性体間の顕著に異なる

化学シフトを示す陽子共鳴の2群が観察された。C20-22結合の飽和によりもたらされるわずかな構造的及び極性変化のために、d h oの両異性体は、カルデノリド上の飽和ラクトン環の特徴である、196 nmでのu v - 最大吸収を有する。H P L Cはこれら2つの構成成分を分解し得るという事実にもかかわらず、質量 - スペクトル分析は、2つのd h o構成成分間のいかなる構造的差異も検出できなかった。しかしながら、N M Rデータはさらに、異性化の存在を支持した。2つの異性体は、化学シフト及びシグナル強度の両方で、ほぼ同一の陽子N M Rスペクトルを明示したが、しかし2群の陽子共鳴は、顕著に異なる化学シフトを示した。2つの異性体は、d h o A及びd h o Bと呼ばれている。

【0084】

実施例19：d h o BのD h - O L Fとの類似性

d h o - A及びd h o - Bはともに、免疫反応性及び酵素阻害活性において類似すると思われるが、しかし、d h o - Bは、そのH P L Aプロフィールに基づいて、本発明の作用物質により類似している。2つの異性体間の差は未だ明らかにされていないが、一方、H P L Cで観察されるD h - O L Fとのd h o - Bのより密接な類似は、d h o - Bが選り抜きの免疫原及び標準分析物であり得ることを示す。2つの異性体の混合物は、d h oに対して生じた抗体がD h - O L Fと交差反応し、D h - O L Fに対して生じた抗体がd h oと交差反応するため、免疫原として、経済的及び慣用的に用い得る。ウアベインまたはO L Fとは交差反応しない。しかしながら、d h o - Bだけは、D h - O L FとH P L Cで同時溶離する。したがって、d h o - Bは、好ましくは、定量的H P L CによるD h - O L Fの概算のための標準分析物としてのD h - O L Fに対する経済的代用品として用いられるべきである。

【0085】

実施例20：過剰レベルのO L F及びD h - O L Fの低減

前記で説明したように、哺乳類は、時として、有害に高レベルのO L F及びD h - O L Fを経験し得る。急性発生は、自発的に、あるいは外因性O L FまたはD h - O L Fの投与のために起こり得る。前者の例としては、本態性高血圧クレーゼ及び妊娠関連症状、例えば非常に高い動脈圧、子癇前症及び子癇が挙げられ

る。器官損害を防止するために、これらのレベルの迅速低減の必要が生じ得る。抗体、さらに好ましくは抗体断片、合成類似体、例えばアプトマー、最も好ましくはFv断片を投与し得る。これらの断片は、産生動物、例えばヒツジまたはヤギにdho-BまたはDh-OLFを注射することにより作製し得る。ポリクローナル抗体の産生は、標的分子を、治療される被験者に対して非免疫原性である担体分子と接合することにより増強し得る。抗体は、プロテイナーゼ、最も好ましくはパパインで消化し、アフィニティークロマトグラフィーにより精製する。クロマトグラフィーカラムは、その固体支持体にdhoまたはDh-OLFを接合し得る。カラム通過時に、Fv断片以外の断片はすべて、結合せずにカラムを通過する。次に純Fv断片は生理食塩水で溶離されて、当業界で一般的な手段によりさらに精製され、非発熱性、滅菌性の、薬理的に許容可能な処方物を生成する。

【0086】

Fv処方物を、過剰のOLFまたはDh-OLF患者に注射または注入する。断片はDh-OLFと強力に結合し、したがって、これは封鎖され、腎臓により排泄される。Dh-OLFが除去されると、OLFとのその平衡は変わり、OLFはDh-OLFに転換される。この転換は、OLF及びDh-OLFのレベルが許容可能、非毒性範囲に成るまで継続する。

【0087】

実施例21：高血圧群の選定

低投与量のDh-OLFは、ナトリウムポンプの活性を増強し、動脈圧を下げると予測される。別個の試験は、1)本態性高血圧症及び2)妊娠誘導性または関連高血圧症、並びに3)甲状腺機能亢進症誘導または関連高血圧症を有する高血圧患者を含む。高血圧患者を、(1)数日間、1日2回Dh-OLFの溶液を自己投与する、または(2)Dh-OLFを含有しない溶液を自己投与する試験群及び対照群の2群に分ける。有志も2群に分けて、同様のプロトコールを投与する。患者の血圧はすべて、毎日午前及び午後の予定の時刻に測定する。

処置高血圧患者の血圧は、対照と比較した場合、低下され、投与期間中保持される。有意の作用は、有志においては観察されなかった。

【0088】

実施例22：眼科群の選定

白内障患者を4群に分けた。第一群は、数日間毎日Dh - OLFの溶液を自己投与し、第二群は、数週間毎に1回、抗Dh - OLF抗体の溶液を注射により注入される。残りの対照群は、溶液のみを自己投与するか、または作用物質を含有しない同様の容量の溶液を注入される。有志も2群に分けて、同様のプロトコールを投与する。

予定時間に医学従事者が患者の眼を検査する。白内障進行程度は、処置白内障患者では、対照と比較した場合、低減される。

【0089】

実施例23：雄性機能不全群の選定

性機能不全患者を、以下の処置を施す4群に分けた：(1)数日間1日2回Dh - OLFの溶液の自己投与、(2)Dh - OLFを含有しない溶液の自己投与、(3)数週間毎に1回、抗Dh - OLF抗体の溶液を注射により注入されるか、または(4)抗体を含有しない溶液を注入される。

有志を2群に分けて、同様のプロトコールを投与する。性機能不全患者は、毎日午前及び午後の予定の時間に検査する。

性機能不全は、対照と比較して処置患者において低減される。

【0090】

実施例24：うっ血性心不全群の選定

心臓疾患患者に4つの異なる処置を施す：グループ1は、種々の日数の間、1日2回Dh - OLFの溶液を自己投与する。グループ2は、当該因子を含有しない溶液を自己投与する。グループ3は、数週間毎に1回、抗Dh - OLF抗体の溶液を注射により注入される。グループ4は、同様の時間に、当該因子を含有しない溶液を注射により注入される。

有志を2群に分けて、同様のプロトコールを投与する。全患者に関する心拍数を毎日患者がモニタリングする。

処置心臓病患者の心拍数は、心臓病患者対照と比較して、低減される。

【0091】

実施例25：アルツハイマー病群の選定

アルツハイマー病と診断された4群の患者は、(1)種々の日数の間、1日2回Dh-OLFの溶液を自己投与し、(2)溶液のみを自己投与し、(3)抗Dh-OLF抗体の溶液を1回、注射により注入されるか、または(4)溶液のみを注入される。有志を2群に分けて、同様のプロトコールを投与する。患者は、毎日午前及び午後の予定の時間にモニタリングされる。

処置患者の行動は、患者対照と比較して、改善される。

【0092】**実施例26：血清検定**

270 μ lの緩衝液及び30 μ lの血清を使い捨て試験管または使い捨て稀釈プレートに分取して、十分に混合することにより、3%BSA、0.05%トウイン20、0.02%トリトンX-100、pH8.3を含有するホウ酸塩緩衝液中で患者の血清を10倍(約1~1000倍の範囲)に稀釈する。

哺乳類Dh-OLFまたはdho標準をヒト血清中で調製して、高及び低稀釈液を含めた1logの予測濃度範囲に及ぶ範囲を網羅する。

【0093】

次に、ピペットを用いて100 μ lの各血清試料をマイクロタイタープレートの各ウエルに移し、プレートを使い捨てプレートシーラーで被覆して蒸発を最小限にし、28 $^{\circ}$ Cで2時間(4~28 $^{\circ}$ Cで2~24時間)インキュベートする。次に各プレートシーラーを取り外し、未反応血清をマイクロプレート洗浄機を用いて吸い出す。次にウエルを洗浄緩衝液で5秒間洗浄し、緩衝液をウエルから吸い出す。この操作をさらに2回反復する。

【0094】

次に、10mM MgCl₂及び1.0mMジチオトレイトールを含む50mMトリス-HCl緩衝液、pH7.8中の0.5mM蛍光的標識抗Fcポリクローナル抗体を含有する反応混合物100 μ lを各ウエル中に分取し、37 $^{\circ}$ Cで30分間、反応を実行させ、1mlホウ酸ナトリウム緩衝液、pH9.0で停止させる。次にフルオロフォアを、335nm/410nm励起/発光波長で蛍光を発するよう誘導する。最後に、「0」目盛値(対照)をフルオロフォアの蛍光値から差し引いて、既知Dh-OLF濃度の試料の蛍

光値を標準曲線上にプロットし、標準曲線からの内挿により、各血清試料中のD
h - O L Fの量を確定する。

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/03669
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : CO7K 16/18, 14/47; A61K 39/385, 39/395 US CL : 530/38; 530/388.9; 424/130; 424/93.1 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) U.S. : 530/38; 530/388.9; 424/130; 424/93.1 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) biosis caplus medline embase japio		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	QAZZAZ et al. Isolation of two chromatographically and biologically distinct components from a dihydrooubain commercial preparation, FASEB Journal., ABSTRACT #1423, 1997. Vol 11. No.9. pA1100	1-2, 30
Y	US 5,695,756 A (BLAUSTEIN et al) 09 December 1997, see entire document,, especially column 1, lines 30-65, column 4, lines 54-63, column 16, lines 30-51 and column 28, lines 37-67.	1-20, 32-34
Y	US 5,844,091 A (BLAUSTEIN et al) 01 December 1998, see entire document, especially column 28, lines 28-67.	21-26 28-29
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B* earlier documents published on or after the international filing date *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 25 APRIL 2000		Date of mailing of the international search report 15 JUN 2000
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer JAYAVANTHI SATISH Telephone No. (703) 306-9047

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/03669

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,429,928 A (BLAUSTEIN et al), 04 July 1995, see entire document, especially page 65, column 30, lines 1-60.	27, 30, 31

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
A 6 1 P	9/12	A 6 1 P	
	25/28		
	27/12		
C 0 7 K	16/18	C 0 7 K	
G 0 1 N	33/53	G 0 1 N	A
// G 0 1 N	33/533		
	33/534		
	33/535		
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W		
(72)発明者	カッザツ, ハッサン エム . エー . エム . アメリカ合衆国, ケンタッキー 40210 , ルイビル, ハロルド アベニュー 1711		
Fターム(参考)	4C084 AA17 MA01 MA52 MA55 MA58 NA14 ZA161 ZA331 ZA361 ZA421 ZC781 4C085 AA13 AA14 BB50 CC04 DD22 DD23 DD33 DD81 EE01 EE05 GG01 GG08 4H045 AA10 AA11 BA10 CA30 CA40 DA86 EA23 GA21		

专利名称(译)	二氢尿嘧啶样因子和诊断和治疗组合物和方法		
公开(公告)号	JP2002540070A	公开(公告)日	2002-11-26
申请号	JP2000598539	申请日	2000-02-11
[标]申请(专利权)人(译)	路易斯维尔研究基金会股份有限公司雷开球德大学		
申请(专利权)人(译)	路易斯维尔研究基金会大学, Incorporated的雷开球德		
[标]发明人	バルデスローランドジュニア カッツァツハッサンエムエーエム		
发明人	バルデス,ローランド ジュニア カッツァツ,ハッサン エム.エー.エム.		
IPC分类号	G01N33/53 A01N45/00 A61K31/7048 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P9/04 A61P9/12 A61P25/28 A61P27/12 C07J19/00 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C07K16/28 G01N33/533 G01N33/534 G01N33/535		
CPC分类号	A61K38/00 A61P25/28 A61P27/12 C07J19/005 C07K14/4703 C07K16/18		
FI分类号	C07K14/47.ZNA A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61P9/04 A61P9/12 A61P25/28 A61P27/12 C07K16/18 G01N33/53.A G01N33/533 G01N33/534 G01N33/535		
F-TERM分类号	4C084/AA17 4C084/MA01 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA58 4C084/NA14 4C084/ZA161 4C084/ZA331 4C084/ZA361 4C084/ZA421 4C084/ZC781 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB50 4C085/CC04 4C085/DD22 4C085/DD23 4C085/DD33 4C085/DD81 4C085/EE01 4C085/EE05 4C085/GG01 4C085/GG08 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA30 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA23 4H045/GA21		
优先权	60/119921 1999-02-12 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

由于与抗OLF抗体结合,基本上不能与哺乳动物的哇巴因样因子(OLF)发生交叉反应,但由于与抗dho抗体的结合而与植物相关的二氢哇巴因(dho)发生交叉反应,在196 nm处。浓度依赖性Na⁺具有最大的uv吸收,具有非肽,非脂质化学结构和完全氢化的内酯环,是OLF的十分之一,是植物相关的二氢哇巴因的三倍,公开了具有K⁺-ATPase(钠泵)催化抑制活性,以及高压液相色谱洗脱时间与dho相同的新型哺乳动物二氢哇巴因样因子。该因素对于充血性心力衰竭的治疗是有用的。对哺乳动物dh-OLF具有亲和力但对OLF不具有亲和力的抗体和抗体片段,以及诊断和治疗方法包括定量抗体和抗体的方法,并且由高水平的OLF或Dh-OLF引起。对于治疗以下症状非常有用 分离出植物相关的二氢哇巴因的两个异构体。这些组合物和方法适合于表征与钠泵活性降低有关的各种疾病和状况。

飽和ラクトン環

