(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0145870
(43) 공개일자 2022년10월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/18 (2006.01) *A61P 9/04* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/1883 (2013.01)
A61P 9/04 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-7032863
(22) 출원일자(국제) 2021년02월19일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년09월21일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2021/076772
(87) 국제공개번호 WO 2021/169845
국제공개일자 2021년09월02일
(30) 우선권주장
202010113391.3 2020년02월24일 중국(CN)
202010174086.5 2020년03월13일 중국(CN)

(71) 출원인
젠순 (상하이) 사이언스 앤드 테크놀로지 컴파니 리미티드
중국 상하이 프리 트레이드 트라이얼 존 줄리 로드 넘버 68 빌딩 2, 3층
(72) 발명자
쪼우, 밍동
오스트레일리아 뉴 사우스 웨일스 2207 웨스트본 벡슬리 엔오.1
(74) 대리인
특허법인 광장리앤고

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **뉴레귤린, 및 조성물을 사용함으로써 심부전을 예방, 치료 또는 지연시키기 위한 방법**

(57) 요 약

본 발명은 인간 심부전을 예방, 치료 또는 지연시키기 위한 약물의 제조에서 뉴레귤린 단백질의 적용, 및 인간 심부전을 예방, 치료 또는 지연시키기 위한 약물의 사용 방법을 제공한다. 방법은 치료 전에 첫번째로 환자를 시험하는 단계로서, NT-proBNP 또는 BNP의 혈장 수준을 검출하는 단계를 포함하는 단계; 및 그 다음에, 시험 결과를 기초로 하여 적절한 치료를 제공하는 단계를 포함한다. 시험 결과가 최적의 치료 범위 내에 있을 때, 환자는 뉴레귤린의 유효 용량 투여에 의한 심부전의 치료에 적합하다.

(52) CPC특허분류
G01N 33/53 (2018.05)
G01N 33/6893 (2013.01)
G01N 2333/58 (2013.01)
G01N 2800/325 (2013.01)
G01N 2800/52 (2021.08)

명 세 서

청구범위

청구항 1

심부전(HF)의 치료를 위한 의약의 제조에서 NRG의 용도로서, 심부전을 앓는 환자는 NT-proBNP의 치료전 혈장 수준이 3000 fmol/mL 이하인 여성 HF 환자인, 용도.

청구항 2

제1항에 있어서,

NRG가 NRG-1인, 용도.

청구항 3

제1항에 있어서,

NRG가 NRG-1의 EGF-유사 도메인을 함유하는 것인, 용도.

청구항 4

제1항에 있어서,

NRG가 서열번호 1의 아미노산 서열을 함유하는 것인, 용도.

청구항 5

치료전 진단 시험을 수행하는 단계 및 시험 결과에 따라 뉴레귤린 치료에 대한 환자의 적격을 결정하는 단계를 포함하는, 뉴레귤린을 이용한 치료에 적합한 HF 환자를 스크리닝하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

진단 시험이 NT-proBNP 또는 BNP의 혈장 수준에 대한 시험인, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

여성 HF 환자가 3000 fmol/mL 이하인 NT-proBNP의 치료전 혈장 수준을 가질 때, 진단 시험 결과가 뉴레귤린을 이용한 치료에 대한 적합성을 나타내는 것인, 방법.

청구항 8

HF 환자에서 NT-proBNP 혈장 수준을 측정하기 위한 면역분석 시약을 함유하는, 뉴레귤린을 이용한 치료에 적합한 HF 환자를 스크리닝하기 위해 사용되는 진단 키트.

청구항 9

제8항에 있어서,

여성 HF 환자가 3000 fmol/mL 이하인 NT-proBNP의 치료전 혈장 수준을 가질 때, 진단 시험 결과가 뉴레귤린을 이용한 치료에 대한 적합성을 나타내는, 진단 키트.

청구항 10

제8항의 진단 키트 및 NRG의 유효 용량을 포함하는, 심부전의 치료를 위한 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 인간 심부전을 예방, 치료 또는 지연시키기 위한 의약의 제조에서 뉴레귤린의 적용 및 상기 의약의 투여를 위한 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 심부전을 앓는 환자의 특정 집단에 뉴레귤린을 포함하는 의약을 투여함으로써 인간 심부전을 예방, 치료 또는 지연시키기 위한 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 뉴레귤린을 포함하는 의약을 사용하여 심부전을 치료하기 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은 치료전 시험 및 시험 결과를 기초로 하는 환자에 대한 적절한 치료의 결정을 포함한다. 치료전 시험 결과가 최적의 치료 범위 내에 있을 때, 심부전을 앓는 환자에 뉴레귤린의 유효 용량을 투여하는 것이 적절하다.

배 경 기 술

[0002] 심부전(HF)은 다양한 심장병에 의해 야기된 심부전증과 연관된 증후군이다. HF를 앓는 환자에 대한 우세한 치료로서, 안지오텐신-전환 효소(ACE) 억제제가 혈관을 확장시키고, 혈압을 낮추고 심장 부하를 감소시키는데 효과적이다. ACE 억제제로 치료된 환자에서 사망률(%)에서의 통계학적으로 유의미한 감소에도 불구하고, 사망률에서의 실제 감소는 평균 3%-4%일 뿐이며, 일부 잠재적 부작용을 갖는다. HF에 대한 다른 예방적 또는 치료적 옵션은 또한 제한을 갖는다. 예를 들어, 심장 이식은 필연적으로 의약에 비해 더욱 비용이 들고 침습적이고 또한 심장 공여자의 가용성에 의해 제한된다. 양심실 심박조율기와 같은 기계적 장치를 이용한 치료 옵션은 또한 침습적이고 비용이 많이 든다. 기존의 요법의 결점으로 인해, 새로운 치료가 급히 필요하다.

[0003] 유망한 새로운 치료는 HF를 앓거나 HF의 위험이 있는 환자에 대한 교세포 성장 인자(GGF)로도 알려진 뉴레귤린(NRG, 뉴레귤린, 헤레귤린(HRG)), 또는 새로운 분화 인자(NDF), 440 KD의 분자량을 갖는 당단백질의 투여를 포함하고; NRG는 세포내 시그널링에 관련된 단백질이며, 이는 수용체 티로신 키나아제의 ErbB 패밀리에 결합된 리간드로서 작용한다. NRG의 패밀리는 NRG1, NRG2, NRG3, 및 NRG4의 4 개의 멤버로 구성된다(Falls et al., Exp Cell Res.284:14-30,2003). NRG는 다양한 생물학적 반응: 유방암 세포의 분화 및 유단백질의 생산 자극, 슈반 세포(Schwann cell)로의 신경능 세포의 분화 유도, 골격근 세포에서 아세틸콜린 수용체의 합성 자극, 및 심근 세포의 생존 및 DNA의 합성 촉진에 관련된다. 중증 뉴레귤린 결핍을 갖는 동형접합 마우스의 배아에서의 생체내(in vivo) 연구로부터의 결과는 뉴레귤린이 심장 및 신경 발달을 위해 필수적이라는 것을 나타내었다. NRG1은 신경계, 심장 및 유선의 발달에서 중요한 역할을 하고; 일부 증거는 NRG1 시그널링이 일부 다른 기관/기관계의 발달 및 기능 및 인간 질환(예컨대, 조현병 및 유방암)의 발병에서 역할을 수행한다는 것을 제시한다. NRG1은 다중 동형(isoform)으로 존재한다. 유전자 돌연변이체 마우스(유전자-녹아웃 마우스)에서의 연구로부터의 결과는 동형의 생체내 기능이 이들의 N-말단 영역 또는 상피 성장 인자(EGF) 유사 영역에 의해 달라진다는 것을 제시하였다. 본 발명은 뉴레귤린 1β(NRG-1β)를 기초로 한다.

[0004] 뉴레귤린 1β는 막관통 단백질이다(Holmes et al.,Science 256,1205-1210,1992). 막외 부분은 Ig-유사 도메인 및 EGF-유사 도메인을 포함한 N 말단이고, 막내 부분은 C 말단이다. 세포외 기질의 금속단백질분해효소의 작용하에, 뉴레귤린의 막외 부분은 효소에 의해 절단되고 유리 상태가 되어, 주위 세포의 표면 상의 ErbB 수용체에 대한 뉴레귤린의 결합을 용이하게 하고 대응하는 세포 시그널링을 활성화시킬 수 있다.

[0005] ErbB 패밀리는 또한 4 개의 멤버, 즉 ErbB1, ErbB2, ErbB3 및 ErbB4를 가지며, 이들 전부는 대략 180-185 KD의 분자량을 갖는 막관통 단백질이다. ErbB2를 제외하고, 이들 전부는 이들의 막외 N 말단에 리간드-결합 도메인을 함유하고; ErbB3을 제외하고, 이들의 막내 C 말단 전부는 단백질 티로신 키나아제의 활성을 갖는다. ErbB1은 상피 성장 인자(EGFR) 수용체인 한편, ErbB3 및 ErbB4는 뉴레귤린 수용체이다. 이들 뉴레귤린 수용체 중, ErbB2 및 ErbB4만이 심장에서 고도로 발현된다(Yarden et al.,Nat Rev Mol Cell Biol,2:127-137,2001).

[0006] ErbB3/ErbB4의 막외 부분에 대한 뉴레귤린의 결합은 ErbB3/ErbB4와 다른 ErbB 패밀리 멤버(보통 ErbB2를 포함함)의 이종이량체화, 또는 ErbB4 자체의 이종이량체화를 야기할 수 있으며, 이는 막내 부분의 인산화를 담당한다(Yarden et al.,Nat Rev Mol Cell Biol,2:127-137,2001). 인산화된 막내 부분은 다중 세포내 시그널링 단백질에 추가로 결합하여, 후속 ERK 또는 AKT 시그널링 경로를 활성화하고, 세포의 증식, 아폽토시스, 이주, 분화 또는 세포부착 자극 또는 억제를 포함한 일련의 세포 반응을 일으킬 수 있다.

[0007] 뉴레귤린은 심장 발달을 위해 특히 필수적이다(WO0037095호, CN1276381호, WO03099300호, WO9426298호, US6444642호, WO9918976호, WO0064400호, Zhao et al.,J.Biol.Chem.273,10261-10269,1998). 초기 배아 발달에서, 뉴레귤린의 발현은 주로 심내막으로 제한되고; 그 다음에, 이는 주변분비 경로를 통해 주위 심근 세포로 방출되고 세포막 상의 단백질 티로신 키나아제 수용체 ErbB4의 막외 부분에 결합된 다음에, ErbB4는 ErbB2와 이종이량체를 형성한다. ErbB4/ErbB2 복합체의 형성 및 활성화는 초기 해면모양 심장에서 심장 섬유주의 형성을 위

해 필수적이다. 뉴레귤린, ErbB4 및 ErbB2 중 임의의 유전자의 결여는 초기 발달 동안 자궁내 태아에서 섬유주의 부재 및 자궁내 태아의 사망을 야기할 것이다. WO0037095호에 따르면, 특정 농도의 뉴레귤린은 ERK 시그널링 경로를 연속으로 활성화시키고, 심근 세포의 성장 및 분화를 촉진하고, 심근 세포 및 세포부착에서 근절중격 및 세포 프레임워크의 재구축을 안내하고, 심근 세포의 구조를 개선하고, 심근 세포의 수축을 강화할 수 있다. 또한, WO0037095호 및 WO0003099300호에서, 뉴레귤린은 많은 심혈관 질환의 검출, 진단 및 치료를 위해 사용될 수 있다는 것이 명시되었다.

[0008] 하기에 본 발명과 관련된 일부 선행 기술의 기술적 문헌이 열거된다: 1.Cardiac muscle function and manipulation:WO0037095호, 2. New applications of growth factor neuregulin and its analogs：CN1276381호；3.Neuregulin based methods and composition for treating cardiovascular diseases:WO03099300호；4.Zhao YY,Sawyer DR,Baliga RR,Opel DJ,Han X,Marchionni MA and Kelly RA.Neuregulins Promote Survival and Growth of Cardiac Myocytes.J.Biol.Chem.273,10261-10269(1998)；5.Methods for treating muscle diseases and disorder:WO9426298호；6.Methods of increasing myotube formation or survival or muscle cell mitogenesis,differentiation or survival using a neuregulin:US6444642.7호.Therapeutic methods comprising use of a neuregulin:WO9918976호；8.Methods for treating congestive heart failure:WO0064400호；9.Holmes WE,Sliwkowski MX,Akita RW,Henzel WJ,Lee J,Park JW,Yansura D,Abadi N,Raab H,Lewis GD,et al.Identification of heregulin,a specific activator p185erbB2.Science 256,1205-1210(1992)；10.Falls DL.Neuregulins:functions,forms and signalingstrategies.Experimental Cell Research,284,14-30(2003).11.Yarden Y,Sliwkowski X.Untangling the ErbB signaling Network.Nature Reviews:Molecular Cell Biology,2127-137(2001).

[0009] 연구는 NRG1의 EGF-유사 도메인이 이들 수용체에 결합하고 활성화시키기에 적합한 대략 50 내지 64 개의 아미노산을 갖는다는 것을 나타내었다. 이전 연구는 뉴레귤린-1β(NRG-1β)가 높은 친화도로 ErbB3 및 ErbB4에 직접 결합할 수 있다는 것을 나타내었다. 희귀 수용체 ErbB2는 동종이량체를 형성하기 위한 ErbB3 또는 ErbB4의 친화도에 비해 높은 친화도로 ErbB3 또는 ErbB4와 이종이량체를 형성할 수 있다. 신경발달 연구로부터의 결과는 교감신경계의 형성이 완전 NRG-1β, ErbB2 및 ErbB3 시그널링 시스템을 요구한다는 것을 제시하였다. NRG-1β, 또는 ErbB2 또는 ErbB4의 표적화된 파괴는 심장의 결과적 발달 결함으로 인해 태아에 치명적일 수 있었다. 최근 연구는 또한 심혈관계의 발달 및 성인의 정상 심장 기능의 유지에서 NRG-1β, ErbB2 및 ErbB4의 중요한 역할을 강조하였다. NRG-1β는 성인 심근 세포의 근섬유분절의 조직 구조를 강화시킬 수 있었다는 것이 나타났다. 재조합 NRG-1β EGF-유사 도메인의 투여는 다양한 HF 동물 모델에서 심근 기능의 퇴화를 상당히 개선하거나 예방할 수 있었으며 유사한 결과가 임상 연구에서 관찰되었다. 그러나, 이 생산물 또는 조성물을 어떻게 사용하고 일부 서브집단에서 양호한 치료 효과를 어떻게 달성할지 명확히 하기 위해 많은 연구가 필요하다. 본 발명에서, 뉴레귤린-함유 의약을 이용한 심부전의 치료를 위한 방법이 제공된다. 상기 방법은 치료전 시험 및 시험 결과를 기초로 하는 환자에 대한 적절한 치료의 결정을 포함한다. 치료전 시험 결과가 최적의 치료 범위 내에 있을 때, 심부전을 앓는 환자에 뉴레귤린의 유효 용량을 투여하는 것이 적절하다.

발명의 내용

[0010] **A. 간단한 요약**

[0011] 뉴레귤린을 이용한 HF의 치료에 대한 임상 연구 동안, 출원인은 뉴레귤린 요법이 뉴욕 심장 학회(NYHA) 기능 분류(New York Heart Association (NYHA) Functional Classification)에 따른 등급화 또는 환자 혈장에서 NT-proBNP 또는 BNP 수준 측정에 의해 스크리닝된 HF 환자에서 상당한 치료 효과를 달성하였다는 것을 발견하였다. 이들 치료 결과는 상당히 감소된 사망률을 포함하였다. 이들 치료 결과는 치료에 대한 상당히 감소된 재입원을 포함하였다. 또한, 연구는 NRG가 HF의 다양한 동물 모델 및 HF를 앓는 환자에서 심근 기능의 열화를 상당히 개선하거나 예방하였다는 것을 나타내었다. 뉴레귤린, 뉴레귤린 폴리펩티드, 뉴레귤린 변이체, 뉴레귤린 유도체, NRG-유사 기능 도메인(들)을 갖는 조성물 또는 뉴레귤린 유사 활성을 갖는 화합물은 전부 본 발명의 범위 내에 있다.

[0012] 본 발명의 제1 양태에서, 심부전의 치료를 위한 유효 용량의 뉴레귤린을 함유하는 약물 조성물이 제공된다. 상기 약물 조성물을 이용한 치료를 받았던 환자는 상당한 치료 결과를 달성하였다. 일부 실시양태에서, 치료 효과는 상당히 감소된 사망률로서 나타났다. 일부 실시양태에서, 치료 효과는 치료에 대한 상당히 감소된 재입원으로서 나타났다. 일부 실시양태에서, 치료 효과는 바이오마커의 감소된 수준으로서 나타났으며, 이는 만성 심부전의 개선을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 약물 조성물은 도입 식이요법 동안 환자에 투여되었다. 일부 실시양

태에서, 도입 식이요법은 적어도 3, 5, 7 또는 10 연속 일 동안 약물 조성물의 반복된 투여를 포함하였다. 일부 바람직한 실시양태에서, 약물 조성물의 투여는 도입 식이요법 후 적어도 3, 6 또는 12 개월 동안 유지되었다. 일부 바람직한 실시양태에서, 유지 식이요법은 3, 5, 7 또는 10 일마다 약물 조성물의 투여를 포함하였다. 바람직한 실시양태에서, 치료된 HF 환자는 여성이었다. 바람직한 실시양태에서, 치료된 HF 환자는 혈장에서 NT-proBNP 수준이 3000 fmol/mL 이하였던 여성 HF 환자 및 혈장에서 NT-proBNP 수준이 1600 fmol/mL 이하였던 남성 HF 환자였다. 바람직한 실시양태에서, 치료된 HF 환자는 혈장에서 NT-proBNP 수준이 3000 fmol/mL 이하였던 여성 HF 환자였다.

[0013] 본 발명의 다른 양태에서, 만성 HF 환자의 생존율을 개선하거나 사망률을 낮추기 위한 방법이 제공되고, 방법은 만성 HF 환자에 대한 유효 용량의 뉴레귤린을 함유한 약물 조성물의 투여를 포함한다. 일부 실시양태에서, 약물 조성물은 도입 식이요법 동안 환자에 투여되었다. 일부 바람직한 실시양태에서, 도입 식이요법은 적어도 3, 5, 7 또는 10 연속 일 동안 약물 조성물의 반복된 투여를 포함하였다. 일부 바람직한 실시양태에서, 약물 조성물의 투여는 도입 식이요법 후 적어도 3, 6 또는 12 개월 동안 유지되었다. 일부 바람직한 실시양태에서, 유지 식이요법은 3, 5, 7 또는 10 일마다 약물 조성물의 투여를 포함하였다. 바람직한 실시양태에서, 치료된 HF 환자는 여성이었다. 바람직한 실시양태에서, 치료된 HF 환자는 혈장에서 NT-proBNP 수준이 3000 fmol/mL 이하였던 여성 HF 환자 및 혈장에서 NT-proBNP 수준이 1600 fmol/mL 이하였던 남성 HF 환자였다. 바람직한 실시양태에서, 치료된 HF 환자는 혈장에서 NT-proBNP 수준이 3000 fmol/mL 이하였던 여성 HF 환자였다.

[0014] 본 발명의 다른 양태에서, 약물 제제에서 뉴레귤린의 적용에 대한 정보가 제공된다. 약물은 만성 심부전 환자에 장기적 이점을 제공할 수 있다. 실시양태에서, 장기적 이점은 개선된 생존을 의미한다. 실시양태에서, 장기적 이점은 감소된 재입원률을 의미한다. 다른 실시양태에서, 장기적 이점은 HF의 장기 예후를 예측할 수 있는 개선된(감소된) 바이오마커를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 약물은 도입 식이요법 동안 환자에 투여되었다. 일부 바람직한 실시양태에서, 도입 식이요법은 적어도 3, 5, 7 또는 10 연속 일 동안 약물의 반복된 투여를 포함하였다. 일부 바람직한 실시양태에서, 환자는 도입 식이요법 후 적어도 3, 6 또는 12 개월 동안 유지 투여를 받았다. 일부 바람직한 실시양태에서, 유지 식이요법은 3, 5, 7 또는 10 일마다 약물의 투여를 포함하였다. 바람직한 실시양태에서, 치료된 HF 환자는 여성이었다. 바람직한 실시양태에서, 치료된 HF 환자는 혈장에서 NT-proBNP 수준이 3000 fmol/mL 이하였던 여성 HF 환자 및 혈장에서 NT-proBNP 수준이 1600 fmol/mL 이하였던 남성 HF 환자였다. 바람직한 실시양태에서, 치료된 HF 환자는 혈장에서 NT-proBNP 수준이 3000 fmol/mL 이하였던 여성 HF 환자였다.

[0015] 본 발명의 다른 양태에서, 뉴레귤린을 이용한 치료에 적합한 HF 환자를 스크리닝하기 위한 방법이 제공된다. 방법은 환자의 NT-proBNP 혈장 수준을 측정하는 단계를 포함한다. 실시양태에서, 4000 fmol/mL 이하의 NT-proBNP 혈장 수준은 HF 환자가 뉴레귤린을 이용한 치료에 적합하였다는 것을 나타내었다는 것이 입증되었다. 다른 실시양태에서, 1600 fmol/mL - 4000 fmol/mL의 범위 내의 NT-proBNP 혈장 수준은 환자의 HF가 뉴레귤린을 이용한 치료에 적합하였다는 것을 나타내었다. 다른 실시양태에서, 1600 fmol/mL 이하의 NT-proBNP 혈장 수준은 환자의 HF가 뉴레귤린을 이용한 치료에 적합하였다는 것을 나타내었다. 다른 바람직한 실시양태에서, 3000 fmol/mL 이하의 NT-proBNP 혈장 수준을 갖는 여성 HF 환자에서의 HF가 뉴레귤린을 이용한 치료에 적합하였다는 것이 나타났다. 다른 바람직한 실시양태에서, 3000 fmol/mL 이하의 NT-proBNP 혈장 수준을 갖는 여성 HF 환자 및 1600 fmol/mL 이하의 NT-proBNP 혈장 수준을 갖는 남성 HF 환자가 뉴레귤린을 이용한 치료에 적합하였다는 것이 나타났다. 다른 바람직한 실시양태에서, 여성 HF 환자는 이들의 NT-proBNP 혈장 수준과 관계 없이 뉴레귤린을 이용한 치료에 적합하였다는 것이 나타났다.

[0016] 본 발명의 다른 양태에서, 뉴레귤린을 이용한 치료에 적합한 HF 환자를 스크리닝하기 위한 방법이 제공된다. 방법은 뉴욕 심장 학회(NYHA) 기능 분류에 따른 환자의 심장 기능의 평가를 포함한다. 실시양태에서, NYHA 클래스 II는 환자의 HF가 뉴레귤린을 이용한 치료에 적합하였다는 것을 나타내었다. 다른 실시양태에서, NYHA 클래스 III은 환자의 HF가 뉴레귤린을 이용한 치료에 적합하였다는 것을 나타내었다.

[0017] 본 발명의 다른 양태에서, 뉴레귤린을 이용한 만성 심부전의 치료를 위한 방법이 제공되었다. 방법은 치료전 평가 절차 및 평과 결과에 따라 뉴레귤린을 이용한 치료를 받기 위한 환자의 적격의 결정을 포함한다. 일부 실시양태에서, 평가 절차는 만성 HF 환자의 NYHA 기능 클래스의 등급화를 포함하였다. 다른 실시양태에서, 평가 절차는 모든 만성 HF 환자의 혈장 NT-proBNP 또는 BNP 수준의 결정을 포함하였다.

[0018] 본 발명의 다른 양태에서, 뉴레귤린을 이용한 치료에 적합한 HF 환자의 스크리닝을 위한 진단 시약 키트가 제공된다. 실시양태에서, 시약 키트는 HF 환자의 NT-proBNP 혈장 수준을 측정하기 위한 면역분석 시약(들)을 함유한

다. 4000 fmol/mL 이하의 수준은 환자가 뉴레귤린을 이용한 HF의 치료에 적합하다는 것을 나타낸다. 다른 실시양태에서, 1600 fmol/mL - 4000 fmol/mL의 범위 내의 NT-proBNP 혈장 수준은 환자의 HF가 뉴레귤린을 이용한 치료에 적합하였다는 것을 나타내었다. 다른 실시양태에서, 1600 fmol/mL 이하의 NT-proBNP 혈장 수준은 환자의 HF가 뉴레귤린을 이용한 치료에 적합하였다는 것을 나타내었다. 다른 바람직한 실시양태에서, 3000 fmol/mL 이하의 NT-proBNP 혈장 수준을 갖는 여성 HF 환자에서의 HF가 뉴레귤린을 이용한 치료에 적합하였다는 것이 나타났다.

[0019] 본 발명의 다른 양태에서, 뉴레귤린을 이용한 만성 HF의 치료를 위한 부수적 진단 시험이 제공된다. N-말단 뇌 나트륨이뇨 펩티드(NT-proBNP)가 진단 시험을 위한 바이오마커로서 사용된다. 일부 실시양태에서, 4000 fmol/mL 이하의 수준은 환자의 HF가 뉴레귤린을 이용한 치료에 적합하였다는 것을 나타내었다. 다른 실시양태에서, 1600 fmol/mL 내지 4000 fmol/mL의 수준은 환자의 HF가 뉴레귤린을 이용한 치료에 적합하였다는 것을 나타내었다. 다른 실시양태에서, 1600 fmol/mL 이하의 NT-proBNP 혈장 수준은 환자의 HF가 뉴레귤린을 이용한 치료에 적합하였다는 것을 나타내었다. 다른 바람직한 실시양태에서, 3000 fmol/mL 이하의 NT-proBNP 혈장 수준을 갖는 여성 HF 환자에서의 HF가 뉴레귤린을 이용한 치료에 적합하였다는 것이 나타났다.

[0020] 본 발명의 다른 양태에서, 뉴레귤린을 이용한 치료를 받기 위한 HF 환자의 적격을 결정하기 위한 부수적 진단 키트가 제공된다. 부수적 진단 키트는 혈장 NT-proBNP 또는 BNP 수준을 결정하기 위한 시약 키트 및 시험 결과에 따라 뉴레귤린 요법을 받기 위한 환자의 적격을 결정하기 위한 사용 설명서를 함유한다.

[0021] 본 발명의 다른 양태에서, 키트가 제공된다. 키트는 유효 용량의 뉴레귤린의 하나 이상의 용기를 포함한다. 단백질은 단독으로 또는 다른 양립가능한 약물/물질과 조합되어 제공되어, 조성물을 형성한다. 바람직한 약물 투여량 형태는 살균 생리식염수, 글루코오스 용액, 완충액 또는 다른 양립가능한 살균액과 조합되어 사용될 수 있다. 선택적으로, 조성물은 동결건조되거나 건조될 수 있다. 실시양태에서, 본 발명에서의 키트는 주사를 위한, 바람직하게는 살균 패키지 내의 바늘 또는 시린지, 및/또는 패키징된 알코올 코튼 볼(cotton ball)을 추가로 포함한다. 다른 실시양태에서, 본 발명에서의 키트는 상황에 따라 약물 조성물의 사용 방법에 대한 의사 또는 환자에 대한 지시를 가질 수 있는 사용 설명서를 추가로 포함한다. 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명에서의 키트는 유효 용량의 NRG 및 시약 키트를 함유하고, 진단 키트는 HF 환자의 NT-proBNP 혈장 수준을 측정하기 위한 면역분석 시약(들)을 함유한다.

[0022] 본 발명의 다른 양태에서, 뉴레귤린은 치료 전에 요법을 위한 적절한 범위의 NT-proBNP 혈장 수준을 갖는 만성 HF 환자에 유효 용량으로 투여된다. 실시양태에서, 요법을 위한 적절한 범위는 4000 fmol/mL 이하였다. 다른 실시양태에서, 요법을 위한 적절한 범위는 1600 fmol/mL 내지 4000 fmol/mL이었다. 다른 실시양태에서, 요법을 위한 적절한 범위는 1600 fmol/mL 이하였다. 다른 바람직한 실시양태에서, 요법을 받을 여성 HF 환자에 대한 적절한 범위는 3000 fmol/mL 이하였다. 다른 바람직한 실시양태에서, 혈장 수준은 면역분석에 의해 결정되었다.

[0023] 본 발명의 다른 양태에서, 뉴레귤린은 심장 기능이 뉴욕 심장 학회(NYHA) 기능 분류에 따라 등급화되는 만성 HF 환자에 유효 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 구체적 기능 클래스는 NYHA 클래스 II였다. 일부 실시양태에서, 구체적 기능 클래스는 NYHA 클래스 III였다.

[0024] B. 정의

[0025] 달리 정의되지 않는 경우, 본원에 사용된 모든 기술적 용어는 발명의 통상의 기술자에 의해 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 모든 특허 문서, 특허 출원 문서, 공개된 특허 문서 및 다른 공보는 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 본원에 기재된 정의가 상술한 참고문헌 중 임의의 것에서의 대응하는 정의와 일치하지 않거나 반대되는 경우, 본원의 정의가 우선해야 한다.

[0026] 맥락에서 명확히 나타내지 않은 경우, 모든 단수 및 복수 한정사/명사(예를 들어, a, an, the, these 등)는 상호교환적이고, '적어도 하나' 및 '하나 이상'은 상호교환적이다.

[0027] 본원에 사용된 "뉴레귤린" 또는 "NRG"는 ErbB2, ErbB3, ErbB4 또는 이들의 이종이량체 또는 동종이량체에 결합하고 이를 활성화시킬 수 있는 단백질 또는 폴리펩티드를 지칭하며, 뉴레귤린 동형, 뉴레귤린의 EGF-유사 도메인, 뉴레귤린 EGF-유사 도메인(들)을 함유한 폴리펩티드, 뉴레귤린 변이체 또는 유도체 및 상술한 수용체를 활성화시킬 수 있는 다른 뉴레귤린-유사 유전자 생산물을 포함한다. 뉴레귤린은 또한 NRG1, NRG2, NRG3 및 NRG4 단백질, 폴리펩티드, NRG-유사 기능을 갖는 단편 및 복합체를 포함한다. 바람직하게는, 뉴레귤린은 ErbB2/ErbB4 또는 ErbB2/ErbB3 이종이량체에 결합하고 이를 활성화시킬 수 있는 단백질 또는 폴리펩티드이다. 제한적이기 보다는 예시적 예를 원용하기 위해, 본 발명의 뉴레귤린은 NRG-1β2 동형의 단편, 즉 EGF-유사 도메인을 함유하는

위치 177-위치 237의 아미노산의 단편이다. 단편은 다음 아미노산 서열을 갖는다: SHLVKCAEKEKTFCVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKAEELYQ（서열번호1）. 본 발명에 사용된 뉴레귤린은 상술한 수용체를 활성화시키고 이들의 생물학적 기능을 조절할 수 있으며; 예를 들어, 이는 골격근 세포에서 아세틸콜린 수용체의 합성을 자극하고, 심근 세포의 분화, 생존 및 DNA 합성을 촉진할 수 있다. 뉴레귤린은 또한 단백질의 생물학적 기능에 실질적으로 영향을 주지 않는 보존적 돌연변이를 갖는 뉴레귤린 변이체를 포함한다. 통상의 기술자에 의해 잘 이해되는 바와 같이, 비-임계 영역에서 단일 아미노산 돌연변이는 일반적으로 단백질 또는 폴리펩티드의 생물학적 기능을 변화시키지 않는다(Watson et. al.,,Molecular Biology of the Gene,4th Edition,1987,The Bejacmin/Cummings Pub.co.,p.224 참고). 본 발명에 사용된 뉴레귤린은 천연 공급원으로부터 단리되거나, 유전적 재조합, 인공 합성 또는 다른 접근법을 통해 얻어질 수 있다.

[0028] 본원에 사용된 "상피 성장 인자-유사 도메인" 또는 "EGF-유사 도메인"은 뉴레귤린 유전자에 의해 코딩되고 ErbB2, ErbB3, ErbB4 또는 이들의 이종이량체 또는 동종이량체에 결합하고 이를 활성화시킬 수 있으며, 다음 참고문헌에 기재된 EGF 수용체 결합 도메인과 구조적으로 유사한 폴리펩티드 단편을 지칭한다: WO 00/64400호, Holmes et. al., Science,256:1205-1210 (1992), 미국 특허 제5,530,109호 및 제5,716,930호, Hijazi et. al., Int.J.Oncol.,13:1061-1067 (1998), Chang et. al., Nature, 387:509-512 (1997), Carraway et. al., Nature, 387:512-516 (1997), Higashiyama et. al., J.Biochem.,122:675-680 (1997), 및 WO 97/09425호. 일부 실시양태에서, EGF-유사 도메인은 ErbB2/ErbB4 또는 ErbB2/ErbB3 이종이량체에 결합하고 이를 활성화시킨다. 일부 실시양태에서, EGF-유사 도메인은 NRG-1의 수용체 결합 도메인의 아미노산을 함유한다. 일부 실시양태에서, EGF-유사 도메인은 NRG-1의 위치 177-226, 위치 177-237 또는 위치 177-240의 아미노산을 지칭한다. 일부 실시양태에서, EGF-유사 도메인은 NRG-2의 수용체 결합 도메인의 아미노산을 함유한다. 일부 실시양태에서, EGF-유사 도메인은 NRG-3의 수용체 결합 도메인의 아미노산을 함유한다. 일부 실시양태에서, EGF-유사 도메인은 NRG-4의 수용체 결합 도메인의 아미노산을 함유한다. 일부 실시양태에서, EGF-유사 도메인은 미국 특허 제5,834,229호에 기재된 다음 아미노산 서열을 함유한다: Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro .

[0029] 뉴레귤린 단백질의 투여의 투여량 형태, 용량 및 경로, 및 양호한 약학 조성물 형태는 당업계에 알려진 방법에 따라 결정될 수 있다(예를 들어, Remington:The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro (Editor) Mack Publishing Company, 1997.4; Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing,and Delivery Systems, Banga, 1999; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, Hovgaard and Frkjr (Ed.),Taylor & Francis,Inc., 2000; Medical Applications of Liposomes, Lasic and Papahadjopoulos (Ed.), Elsevier Science, 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, Dole et al (Ed.), SpringerVerlag New York,1999 참고).

[0030] 뉴레귤린 단백질은 경구, 직장, 국소, 흡입, 구강(설하), 비경구적(예를 들어, 피하, 근육내, 피내 또는 정맥내), 경피 또는 다른 적절한 투여 경로로 제조될 수 있다. 이들 투여 방식 전부 중에서, 가장 적절한 것은 질환의 특성 및 중증도, 및 사용될 특별한 뉴레귤린 단백질의 특성에 따라 결정될 수 있다. 뉴레귤린 단백질은 단독으로 투여되거나; 더욱 적절하게는, 약물 양립가능한 담체 또는 부형제와 공동-투여될 수 있다. 임의의 적절한 약물 허용 담체 또는 부형제는 현재 최근 방법에 사용될 수 있다(예를 들어, Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Alfonso R.Gennaro (Editor) Mack Publishing Company,April 1997 참고).

[0031] 본 발명에 따르면, 뉴레귤린 단백질 단독 또는 다른 배지, 담체, 부형제로 제조된 다양한 이의 생산물이 많은 적절한 투여 경로, 예컨대 해면내 주사, 피하 주사, 정맥내 주사, 근육내 주사, 피내 주사, 경구 또는 구강 투여를 위해 사용될 수 있었다. 이는 보존제의 첨가와 함께 앰플 또는 다중-용량 용기 내의 단위 투여량 형태로 투여될 수 있다. 이는 현탁액, 용액, 수성 또는 버터성 에멀션과 같은 투여량 형태로 제조될 수 있고, 현탁제, 안정제 및/또는 분산제가 첨가될 수 있거나; 활성 성분은 사용 전에 분말 형태일 수 있고, 적절한 배지, 예컨대 살균 및 무발열성 물 또는 다른 용매로 용해된다. 본 발명의 약물은 국소 생산물로서 사용될 때, 발포성 조성물, 겔, 회반죽, 경피 패치 또는 페이스트 등으로 제조될 수 있다.

[0032] 본 발명의 약물에 대해, 허용 구성요소 및 투여 방식은, 비제한적으로, 미국 특허 제5,736,154호, 제6,197,801B1호, 제5,741,511호, 제5,886,039호, 제5,941,868호, 제6,258,374B1호, 및 제5,686,102호에 공개된

것을 포함한다.

[0033] 치료 또는 예방에서 치료 용량의 규모는 치료될 병태의 중증도 및 투여의 경로에 의해 달라질 것이다. 용량, 및 아마도 용량 빈도는 또한 개별 환자의 연령, 체중, 병태 및 반응에 따라 달라질 것이다.

[0034] 담당의는 독성 또는 역반응의 경우에 언제 어떻게 치료를 종료하거나 중단시키거나 투여량을 조절/감소시킬지 알아야 한다는 것이 주목할 만하다. 반대도 마찬가지로, 임상 반응이 불만족스러운 경우에, 의사는 또한 언제 어떻게 용량을 높은 수준으로 조절해야 하는지 알아야 한다.

[0035] 투여의 임의의 적절한 경로가 사용될 수 있다. 약물은 정제, 로젠지, 카세제, 분산액, 현탁액, 용액, 캡슐, 패치 등과 같은 투여량 형태로 제조될 수 있고, 예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences를 참고한다. 실제 용도에서, 뉴레귤린 단백질은 단독으로 또는 다른 약제와 조합되어 통상적인 약학 조제 기술에 따라 약학 담체 또는 부형제, 예컨대 베타-사이클로덱스트린 및 2-하이드록시-프로필-베타-사이클로덱스트린과 친밀한 혼합물에서 활성제로서 조합될 수 있다. 담체는 국소 또는 비경구 투여를 위해 소망하는 제제의 광범위한 형태를 취할 수 있다. 비경구적 투여량 형태, 예컨대 정맥내 주사 또는 주입을 위한 조성물 제조시, 통상의 기술자에게 알려진 물, 글리콜, 오일, 완충액, 당, 보존제, 리포솜 등의 유사한 약학적 배지가 이용될 수 있다. 이러한 비경구적 조성물의 예는, 비제한적으로, 덱스트로오스 5% w/v, 생리식염수 또는 다른 용액을 포함한다. 투여될 뉴레귤린 단백질 단독 또는 다른 약제와의 조합의 총 용량은 약 1 mL 내지 2000 mL의 범위의 정맥내 주사액의 바이알로 투여될 수 있다. 희석액의 부피는 투여되는 총 용량에 따라 달라질 것이다.

[0036] 본 발명은 또한 치료 식이요법의 시행을 위한 키트를 제공한다. 키트는 유효 용량의 뉴레귤린 단백질의 하나 이상의 용기를 포함한다. 단백질은 단독으로 또는 다른 허용 약물/물질과 조합되어 제공되어, 조성물을 형성한다. 바람직한 약학적 형태는 살균 생리식염수, 덱스트로오스 용액, 또는 완충액, 또는 다른 약학적 허용 살균액과 조합될 것이다. 대안적으로, 조성물은 동결건조되거나 건조될 수 있고; 이 경우에, 키트는 선택적으로 복합체를 재구성하여, 주사 목적을 위한 용액을 형성하기 위해 용기 내에 약학적 허용 용액, 바람직하게는 살균제를 추가로 포함한다. 예시적 약학적 허용 용액은 생리식염수 및 덱스트로오스 용액이다.

[0037] 본원의 "요법" 또는 "치료"는 병태, 장애 또는 질환의 증상이 개선되거나 이와 달리 유리하게 변경되는 임의의 방식을 지칭한다. 효과는 질환 또는 이의 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방하는 면에서 예방적일 수 있고/있거나 질환에 대한 부분적 또는 완전 치유 및/또는 질환에 기인하는 역효과의 면에서 치료적일 수 있다. 치료는 또한 본원의 조성물의 임의의 약학적 용도를 포함한다.

[0038] 본원에 사용된 바와 같이, "심부전"은 심장이 조직 대사의 요건을 위해 필요한 속도로 혈액을 펌핑하지 않는 심장 기능의 이상을 의미한다. 심부전은 광범위한 질환 상태, 예컨대 울혈성 심부전, 심근경색증, 빈맥, 가족성 비후성 심근병증, 허혈성 심장병, 특발성 확장성 심근병증, 심근염 등을 포함한다. 심부전은, 비제한적으로, 허혈성, 선천적, 류마티스성, 바이러스성, 독성 또는 특발성 형태를 포함한 임의의 수의 인자에 의해 야기될 수 있다. 만성 심장 비대는 상당히 감소된 상태이고, 이는 울혈성 심부전 및 심장 마비에 대한 전구체이다.

[0039] 맥락에서 달리 나타내지 않는 경우, 본원에 사용된 "단백질" 및 "폴리펩티드", "펩티드"는 동일한 의미를 갖는다.

[0040] 맥락에서 달리 나타내지 않는 경우, 본원에 사용된 "혈장" 및 "혈청"은 동일한 의미를 갖는다.

[0041] 맥락에서 달리 나타내지 않는 경우, 본원에 사용된 "이하"는 "적거나 동일한"을 지칭한다.

[0042] 본원에 사용된 바와 같이, "장기적 이점"은 치료 또는 간섭 이후 짧은 기간에 관찰되지 않을 수 있는 치료 또는 간섭에 의해 야기된 이점을 의미한다. 만성 심부전 환자에 대해, 장기적 이점은 생존의 개선, 재입원의 감소 또는 장기 예후를 나타내는 바이오마커의 개선일 수 있다. 일부 실시양태에서, 이점의 관찰을 위한 기간은 약 6 개월이다. 일부 실시양태에서, 이점의 관찰을 위한 기간은 약 1 년이다. 일부 실시양태에서, 이점의 관찰을 위한 기간은 약 2 년이다. 또한, 다른 실시양태에서, 이점의 관찰을 위한 기간은 약 3 년, 5 년, 10 년 이상이다.

[0043] 본원에 사용된 바와 같이, "생존"은 한 대상체가 살아 있는 채로 유지되거나 생활을 유지할 수 있는 시간 또는 확률을 의미한다. 이는 생존 시간 또는 생존율에 의해 표현될 수 있다. 생존 시간은 진단 또는 치료로부터 시작하여 삶의 종료까지의 기간이다. 생존율은 진단 또는 치료 이후에 주어진 기간 동안 살아 있는 사람의 비율을 의미한다. 각각의 대상체에 대해, 치료 또는 간섭에 의해 야기된 연장된 생존 시간은 이점으로서 여겨질 수 있다. 대상체의 그룹 또는 큰 집단에 대해, 연장된 평균 생존 시간 또는 증가된 생존율은 이점으로서 여겨질 수 있다.

[0044] 본원에 사용된 바와 같이, "재입원"은 주어진 기간에 병원에 입원한 환자의 시간 또는 빈도를 의미한다. 병원에 대한 입원은 모든 병태에 의해 야기되거나, 치료되는 동일한 병태에 의해서만 야기될 수 있다. 각각의 대상체에 대해, 주어진 기간 내의 재입원의 시간의 감소는 이점으로서 여겨질 수 있다. 또한, 대상체의 그룹 또는 큰 집단에 대해, 재입원의 총 시간 또는 평균 시간의 감소는 이점으로서 여겨질 수 있다.

[0045] 본원에 사용된 바와 같이, "N-말단 뇌 나트륨이뇨 펩티드" 또는 "NT-proBNP"는 비활성 나머지 N-말단 proBNP를 의미하고, 후자는 좌심실벽에서 심장근육세포로부터 주로 방출되는 호르몬적으로 활성인 나트륨이뇨 펩티드인 BNP의 프로호르몬이다. 심근벽의 신장 및 긴장에 대한 반응시, 프로호르몬 proBNP는 단백분해 절단에 의해 BNP 및 호르몬적으로 비활성인 나머지 NT-proBNP로 나뉘어 떨어진다.

[0046] BNP 및 NT-proBNP 혈장 수준은 의심되거나 수립된 심부전의 일일 관리에서 유망한 도구이다. 임상 실습에서 BNP 및 NT-proBNP의 용도에 대한 대부분의 연구는 이들의 진단 특성을 다루었고, BNP 및 NT-proBNP의 진단 가치를 지지하는 증가하는 양의 증거가 이용가능하다. NT-proBNP는 BNP에 비해 혈액에서 약 6 배 긴 반감기를 갖기 때문에, 이는 심부전에 대한 진단 또는 예후 마커로서 더욱 광범위하게 사용된다. 혈장 NT-proBNP 수준은 상업적 키트에 의해 분석될 수 있다. 예시의 목적으로, 비제한적으로, Roche 또는 Biomedica로부터의 상업적 키트.

[0047] 혈장에서 BNP 및 NT-proBNP 수준 둘 다는 심부전의 스크리닝, 진단을 위해 사용되고, 심부전에서 예후를 수립하기 위해 유용하며, 이는 양측 마커가 통상적으로 악화된 결과를 갖는 환자에서 높기 때문이다. 또한, BNP 또는 NT-proBNP의 혈장 수준은 뉴레큘린에 의한 심부전 치료에 적합한 환자를 나타낸다는 것이 본 발명에서 발견되었다.

[0048] 본원에 사용된 바와 같이, "뉴욕 심장 학회(NYHA) 기능 분류" 또는 "NYHA" 심장 기능 분류는 심부전의 정도를 분류하는 간단한 방식이다. 이는 환자를 이들이 얼마나 많이 신체적 활동 동안 제한되는가를 기초로 하여 4 개의 범주 중 하나에 위치시키며; 제한/증상은 정상 호흡 및 숨가쁨 및/또는 협심통의 달라지는 정도에 관한 것이다: I, 증상이 없고 일상 신체적 활동에 제한이 없음, 예를 들어 걷고, 계단을 오를 때 숨가쁨 등; II, 경증 증상(경증 숨가쁨 및/또는 협심증) 및 일상 활동 동안 약간의 제한; III, 일상보다 적은 활동, 예를 들어 짧은 거리(20-100 m)를 걷는 동안에도 불구하고, 증상으로 인해 활동에서 뚜렷한 제한이 있고, 휴식시에만 편안함; 및 IV, 중증 제한, 휴식 중에도 불구하고 증상을 겪음, 대부분 와상 환자.

[0049] 본원에 사용된 바와 같이, "활성 단위" 또는 "EU" 또는 "U"는 50% 최대 반응을 유도할 수 있는 표준 생산물의 정량을 의미한다. 다시 말해, 주어진 활성제에 대한 활성 단위를 결정하기 위해, EC50이 측정되어야 한다. 예를 들어, 생산물의 배치(batch)에 대한 EC50이 0.1 pg인 경우, 이는 1 단위일 것이다. 또한, 상기 생산물 1 pg가 사용되면, 10 EU(1/0.1)가 사용되는 것이다. EC50은 본 발명자들에 의해 이용된 방법을 포함하여, 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 결정될 수 있다. 활성 단위의 이 결정은 유전적으로 조작된 생산물 및 임상적으로 사용된 약물의 품질 제어를 위해 중요하고, 상이한 제약 및/또는 상이한 배치 번호로부터의 생산물이 균일한 기준으로 정량화되도록 허용한다.

[0050] 다음은 NRG와 세포 표면 ErbB3/ErbB4 분자의 조합 및 ErbB2 인산화의 간접 매개를 통한 NRG-1의 생물학적 활성의 결정을 위한 예시적이고, 신속하고, 민감하고, 높은 플럭스의 정량적 방법이다(예를 들어, Michael D. Sadick et al., 1996, Analytical Biochemistry, 235:207-214 및 WO03/099300호 참고).

[0051] 간단하게는, 키나아제 수용체 활성화 효소-연결된 면역흡착 분석(KIRA-ELISA)으로 지칭되는 분석은 세포 배양, 리간드 자극, 및 세포 용해/수용체 가용화를 위한 하나 및 수용체 포획 및 포스포티로신 ELISA를 위한 다른 플레이트의 2 개의 별도 미세정량판으로 구성된다. 분석은 NRG-유도된 ErbB2 활성화의 분석을 위해 개발되었고 유착성 유방암종 세포주, MCF-7 상의 온전한 수용체의 자극을 이용한다. 막 단백질은 Triton X-100 용해를 통해 가용화되고 수용체는 ErbB3 또는 ErbB4에 대해 교차-반응이 없는 ErbB2-특이적 항체로 코팅된 ELISA 웰에서 포획된다. 그 다음에, 수용체 인산화의 정도가 항인산화티로신 ELISA에 의해 정량화된다. 재생가능한 표준 곡선은 헤레큘린 베타 1(177-244)에 대해 대략 360 pM의 EC50으로 생성된다. HRG 베타 1(177-244)의 동일한 샘플이 KIRA-ELISA 및 정량적 항인산화티로신 웨스턴 블롯 분석 둘 다에 의해 분석될 때, 결과는 서로 매우 근접하게 상관관계가 있다. 이 보고서에 기재된 분석은 HRG와 ErbB3 및/또는 ErbB4의 상호작용으로부터 야기되는 ErbB2의 티로신 인산화를 구체적으로 정량화할 수 있다.

[0052] 대부분의 유전적으로 조작된 의약은 단백질 및 폴리펩티드이기 때문에, 이들의 활성은 이들의 아미노산 서열 또는 이들의 공간 구조에 의해 형성된 활성 중심에 의해 결정될 수 있다. 단백질 및 폴리펩티드의 활성 역가는 이들의 절대 품질과 일치하지 않으며, 따라서 화학적 약물의 것과 같은 중량 단위로 결정될 수 없다. 그러나, 유

전적으로 조작된 의약의 생물학적 활성은 일반적으로 이들의 약력학과 일치하고 주어진 생물학적 활성을 통해 수립된 역가 결정 시스템은 이의 역가 단위를 결정할 수 있다. 따라서, 생물학적 활성 결정은 생물학적 활성을 이용한 물질의 적정 과정의 부분일 수 있고 유전적으로 조작된 생산물의 품질 제어의 중요한 구성요소이다. 유전적으로 조작된 생산물 및 임상적으로 사용된 약물의 품질 제어를 위해 생물학적 활성 기준을 결정하는 것이 중요하다.

[0053] 50% 최대 반응을 유도할 수 있는 표준 생산물의 정량은 활성 단위(1 EU)로서 정의된다. 따라서, 상이한 제약 및 상이한 배치 번호로부터의 생산물은 균일한 기준으로 정량화될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] **실시양태 1: 표준 처치를 기초로 한 만성 심부전을 앓는 환자에서 재조합 인간 뉴레귤린의 무작위화된, 이중-맹검, 다중-중심, 위약 제어된 생존 연구(연구 209).**

[0055] 만성 심부전 2 기의 처치에서 주사를 위한 재조합 인간 뉴레귤린(rhNRG-1)의 효능을 평가하기 위해, 이중-맹검, 다중-중심, 위약 제어된 표준 처치 기반 연구를 중국 내의 다중 임상 센터에서 수행하였다. 총 351 명의 NYHA 클래스 III 또는 클래스 IV 만성 심부전을 앓는 환자를 등록하고 위약 그룹 또는 rhNRG-1 그룹(0.6 μg/kg)으로 무작위화하였다. 인구통계 및 배경 처치의 면에서 그룹 사이에 유의미한 차이는 없었다. 환자를 예정된 바와 같이 10 연속 일 동안 약물의 투여를 위해 병원에 입원시키고 11 일차(D11)에 퇴원시켰다. 3 주차 내지 25 주차에, 환자에게 외래 진료부에서 매주 용량을 투여하였다. 혈액 샘플을 처치 전 및 각각의 투여 후 환자로부터 수집하였다. 중앙 실험실에 의한(Biomedica로부터의 시약 키트 이용) 혈장에서 NT-proBNP 수준의 결정. 연구의 52 주차에, 환자의 생존에 대한 정보를 수집하였다.

[0056] 조사 생산물:

[0057] 설명: rhNRG-1, 61 개 아미노산 폴리펩티드는 7054 Dal(1 pg=0.14 nmol)의 분자량을 갖는 뉴레귤린-1 β2 동형의 EGF-유사 도메인을 포함한다.

[0058] 위약:

[0059] 설명: rhNRG-1에 대한 부형제(활성 재조합 인간 뉴레귤린-1 단백질이 없는 250 pg/바이알).

[0060] 투여량 식이요법:

[0061]

	1-10 일	3-25 주
용량	0.6μg/kg/일 rhNRG-1 또는 위약	0.8μg/kg/일 rhNRG-1 또는 위약
투여 경로	정맥내 점적	정맥내 주입
처치 과정	10 시간/일, 10 연속 일 동안	매주 10-분 주입

[0062] 시험에 대한 참여를 위한 기준은 18 내지 65 세 연령, LVEF≤40%, 비교적 안정적인 임상 조건(1 개월 초과 동안 표적 용량 또는 최대 허용 용량에서 CHF에 대한 임상 징후, 증상 및 허용된 표준 처치를 포함함)의 CHF(NYHA 클래스 III 또는 IV)를 앓는 환자를 포함하였다. 주요 배제 기준은 급성 심근경색증, 비후성 심근병증, 수축성 심막염, 중대한 판막 질환 또는 선천적 심장병, 중증 폐 고혈압, 수축기 혈압 <90mmHg 또는 >160mmHg, 중증 심실부정맥, 이전 6 개월 이내의 심장 수술 또는 뇌혈관 사고, 폐소공포증 또는 임신 여성 대상체를 포함하였다. 모든 환자는 서명된 서면 동의서를 제공하였다.

[0063] **실시양태 2: 표준 처치를 기초로 한 만성 심부전을 앓는 환자에서 재조합 인간 뉴레귤린의 다중-중심, 무작위화된, 이중-맹검, 위약 제어된 생존 연구(연구 301).**

[0064] 만성 심부전 3 기의 처치에서 주사를 위한 재조합 인간 뉴레귤린(rhNRG-1)의 효능을 평가하기 위해, 이중-맹검, 다중-중심, 위약 제어된 표준 처치 기반 연구를 중국 내의 다중 임상 센터에서 수행하였다. 총 331 명의 NYHA 클래스 III 또는 클래스 IV 만성 심부전을 앓는 환자를 등록하고 위약 그룹 또는 rhNRG-1 그룹(0.6 μg/kg) 또는 rhNRG-1 그룹(1.0 μg/kg)으로 무작위화하였다. 인구통계 및 배경 처치의 면에서 그룹 사이에 유의미한 차이는 없었다. 환자를 예정된 바와 같이 10 연속 일 동안 약물의 투여를 위해 병원에 입원시키고 D11에 퇴원시켰다. 3 주차 내지 25 주차에, 환자에게 외래 진료부에서 매주 용량을 투여하였다. 혈액 샘플을 처치 전 및 각각의 투여

후 환자로부터 수집하였다. 중앙 실험실에 의한(Biomedica로부터의 시약 키트 이용) 혈장에서 NT-proBNP 수준의 결정. 연구의 52 주차에, 환자의 생존에 대한 정보를 수집하였다.

[0065] 조사 생산물:

[0066] 설명: rhNRG-1, 61 개 아미노산 폴리펩티드는 7054 Dal(1 pg=0.14 nmol)의 분자량을 갖는 뉴레귤린-1 β2 동형의 EGF-유사 도메인을 포함한다.

[0067] 위약:

[0068] 설명: rhNRG-1에 대한 부형제(활성 재조합 인간 뉴레귤린-1 단백질이 없는 250 pg/바이알).

[0069] 투여량 식이요법:

[0070]

	1-10 일	3-25 주
용량	0.6 μg/kg/일 rhNRG-1또는1.0 μg/kg/일 rhNRG-1 또는 위약	0.8μg/kg/일 rhNRG-1 또는 위약
투여경로	정맥내 점적	정맥내 주입
처치과정	10 시간/일, 10 연속 일 동안	매주 10-분 주입

[0071] 시험에 대한 참여를 위한 기준은 18 내지 80 세 연령, LVEF≤40%, 비교적 안정적인 임상 조건(1 개월 초과 동안 표적 용량 또는 최대 허용 용량에서 CHF에 대한 임상 징후, 증상 및 허용된 표준 처치를 포함함)의 CHF(NYHA 클래스 III 또는 IV)를 앓는 환자를 포함하였다. 주요 배제 기준은 급성 심근경색증, 비후성 심근병증, 수축성 심막염, 중대한 판막 질환 또는 선천적 심장병, 중증 폐 고혈압, 수축기 혈압 <90mmHg 또는 >160mmHg, 중증 심실부정맥, 이전 6 개월 이내의 심장 수술 또는 뇌혈관 사고, 폐소공포증 또는 임신 여성 대상체를 포함하였다. 모든 환자는 서명된 서면 동의서를 제공하였다.

[0072] **실시양태 3: 표준 처치를 기초로 한 만성 심부전을 앓는 환자에서 재조합 인간 뉴레귤린의 다중-중심, 무작위화된, 이중-맹검, 위약 제어된 생존 연구(연구 305).**

[0073] 만성 심부전의 처치에서 주사를 위한 재조합 인간 뉴레귤린(rhNRG-1)의 효능을 평가하기 위해, 이중-맹검, 다중-중심, 위약 제어된, 표준 처치 기반 연구를 중국 내의 다중 임상 센터에서 수행하였다. 총 679 명의 NYHA 클래스 II 또는 클래스 III 만성 심부전을 앓는 환자를 등록하고 위약 그룹 또는 rhNRG-1 그룹(0.6 μg/kg)으로 무작위화하였다. 인구통계 및 배경 처치의 면에서 그룹 사이에 유의미한 차이는 없었다. 환자를 예정된 바와 같이 10 연속 일 동안 약물의 투여를 위해 병원에 입원시키고 D11에 퇴원시켰다. 3 주차 내지 25 주차에, 환자에게 외래 진료부에서 매주 용량을 투여하였다. 혈액 샘플을 처치 전 및 각각의 투여 후 환자로부터 수집하였다. 중앙 실험실에 의한(Biomedica로부터의 시약 키트 이용) 혈장에서 NT-proBNP 수준의 결정. 연구의 52 주차에, 환자의 생존에 대한 정보를 수집하였다.

[0074] 조사 생산물:

[0075] 설명: rhNRG-1, 61 개 아미노산 폴리펩티드는 7054 Dal(1 pg=0.14 nmol)의 분자량을 갖는 뉴레귤린-1 β2 동형의 EGF-유사 도메인을 포함한다.

[0076] 위약:

[0077] 설명: rhNRG-1에 대한 부형제(활성 재조합 인간 뉴레귤린-1 단백질이 없는 250 pg/바이알).

[0078] 투여량 식이요법:

	1-10 일	3-25 주
용량	0.6 μg/kg/일 rhNRG-1 또는 위약	0.8μg/kg/일 rhNRG-1 또는 위약
투여 경로	정맥내 점적	정맥내 주입
처치 과정	10 시간/일, 10 연속 일 동안	매주 10-분 주입

[0079]

[0080] 임상 연구에 대한 참여를 위한 기준: 18 내지 75 세 연령, LVEF≤40%, 안정적인 임상 증상(임상 증상, 신체적 징후를 포함함), 1 개월 초과 동안 표적 용량 또는 최대 허용 용량의 치유의 HF 기본 표준을 받았던, 만성 HF 환자(NYHA 클래스 II 또는 III). 배제 기준: 급성 심근경색증, 비후성 심근병증, 협착성 심막염, 중요한 판막 병리학적 변화 또는 선천적 심장병, 중증 폐동맥 고혈압, 수축기 혈압 <90mmHg 또는 >160mmHg, 중증 심실 부정맥, 연구 전 6 개월 내에 심장 수술 처치를 받았거나 뇌혈관 사고를 겪은 환자, 폐소공포증 또는 임신 여성. 모든 환자는 동의서 양식을 이해하고 서명할 필요가 있다.

[0081] 출원인은 3 개의 별도 임상 연구로부터의 데이터의 통계학적 분석을 수행하였다. 모든 여성 대상체(NYHA 클래스 II-IV의 경증, 중간, 중증 환자)에서 3 개의 별도 임상 연구로부터 풀링된(pooled) 데이터의 분석으로부터의 결과: 치료-기반 위약-제어된 그룹의 표준에서의 환자에 대해 처치 그룹의 여성은 통계학적으로 유의미한 생존 이점(P=0.016)을 달성하였다. 연구 기간에, 대상체의 전-원인 사망률은 50% 이상 감소하였다. 별도 연구 각각에서, 처치 그룹의 모든 여성은 생존 이점을 달성하였으며, 3 개의 연구로부터 풀링된 데이터의 분석으로부터의 것과 동일한 경향을 나타내었다.

[0082] 풀링된 데이터로부터의 결과: 일반적으로 말하면, 연구 기간 동안, 대상체의 기준선 NT-proBNP 수준이 낮을수록, 이들의 생존 이점은 크고(전-원인 사망률의 상대적 감소); 기준선에 3000 fmol/mL 이하의 NT-proBNP 수준을 가졌던 여성 대상체 중에서, 처치 그룹의 여성 대상체는 0%의 사망률을 가졌고; 반대로, 치료-기반 위약-제어된 그룹의 표준에서 대상체의 전-원인 사망률은 거의 10%였고; 처치 그룹의 대상체는 통계학적으로 매우 유의미한 생존 이점(P<0.001)을 달성하였다. 별도 연구 전부에서, 여성 대상체는 풀링된 데이터의 분석에서의 것과 동일한 생존 이점에 대한 경향을 나타내었다.

[0083] 임상 연구는 rhNRG-1이 경증 내지 중간 심부전을 앓는 환자를 더욱 효과적으로 확인할 수 있었다는 것을 드러냈으며, 이는 대동맥의 협착에 의해 유도된 HF 쥐(rat) 모델에서의 연구로부터의 결과에 의거하였다. 심장이 편향되고 혈액 펌핑 기능이 붕괴되는 더욱 심각한 단계로 HF가 진행되었을 때, ErbB2 및 ErbB4 수용체의 발현이 상당히 감소할 것이라는 것이 나타났다. 이를 고려하여, HF의 초기 단계에, 즉 ErbB2/ErbB4 수용체 발현의 하향조절 전에, 재조합 인간 뉴레귤린은 환자에게 많은 이점을 전달할 수 있다.

표 1. 전-원인 사망률 – 서브그룹 분석의 요약: (연구 209/301/305 로부터의 풀링된 데이터의 분석)

변수	n/N(%)	
	rhNRG-1	위약
종합	80/728(11.0)	77/633(12.2)
성별		
남성	68/560(12.1)	53/484(11.0)
여성	12/168(7.1)	24/149(16.1)
기준선의 NYHA 클래스		
클래스 II	9/138(6.5)	10/137(7.3)
클래스 III	46/501(9.2)	59/441(13.4)
클래스 IV	25/89(28.1)	8/55(14.5)
기준선의 NT-proBNP		
≤1600 fmol/ml	7/349(2.0)	21/332(6.3)
1600-4000 fmol/ml	37/238(15.5)	29/190(15.3)
≥4000 fmol/ml	30/95(31.6)	22/81(27.2)
스키핑(Skipping)	6/46(13.0)	5/30(16.7)

약어: LVEF=좌심실 박출률, N=분석된 대상체의 총 수, n=특정 범주에서 대상체의 수, NYHA=뉴욕 심장 학회

[0084]

[0085] 기준선 NT-proBNP가 ≤1600 fmol/mL이었다는 것을 분석 결과가 드러냈을 때, rhNRG-1은 대상체의 성별과 관계없이 대상체의 사망률을 상당히 낮출 가능성을 나타내었으나(표 1); 이 결론은 높은 기준선 NT-proBNP를 갖는 양측 성별의 대상체로부터 풀링된 데이터의 분석에 적용되지 않는다. 또한, 분석은 rhNRG-1이 모든 시험 여성 대상체에서 통계학적으로 유의미하게 낮은 사망률을 야기하였다는 것(표 1)을 드러냈다. 표 2에 나타낸 바와 같이, 여성은 동일한 경향을 나타내었다는 것을 개별 연구 209, 301 및 305에서 발견하였다.

표 2. 전-원인 사망률 - 서브그룹 분석의 요약: 단일 임상 연구 (연구 209/301/305 의 분석)

	209		301		305	
	n/N(%)		n/N(%)		n/N(%)	
변수	rhNRG-1	위약	rhNRG-1	위약	rhNRG-1	위약
종합	18/175(10.3)	29/176(16.5)	34/214(15.9)	14/117(12.0)	28/339(8.3)	34/340(10.0)
성별						
남성	14/142(9.9)	18/138(13.0)	32/168(19.0)	10/86(11.6)	22/250(8.8)	25/260(9.6)
여성	4/33(12.1)	11/38(28.9)	2/46(4.35)	4/31(12.9)	6/89(6.7)	9/80(11.3)

약어: LVEF=좌심실 박출률, N=분석된 대상체의 총 수, n=특정 범주에서 대상체의 수, NYHA=뉴욕 심장 학회

[0086]

[0087] 기준선 NT-proBNP 백분위수를 여성 대상체에 대해 추가로 서브그룹 분석을 거쳤으며, 이는 이들이 풀링된 연구 및 개별 연구 둘 다에서 양호한 개선을 나타냈기 때문이다. 표 3에 나타낸 바와 같이, 이들 서브그룹을 NT-proBNP≤1600 fmol/mL(~50%), NT-proBNP≤3000 fmol/mL(~75%) 및 모든 여성 환자인 환자에 대한 풀링 및 단일 분석을 거쳤다.

[0088] 3 개의 임상 연구 209, 301 및 305의 풀링된 분석은 여성 대상체의 사망률이 rhNRG-1 처치에 대한 여성 대상체의 3 개의 서브그룹, 즉 요법에 대한 서브그룹 NT-proBNP≤1600, 서브그룹 NT-pro BNP≤3000 fmol/mL, 및 모든 여성 환자에서 각각 0%, 0% 및 7.1%였다는 것을 드러냈다. 위약에 대한 대상체의 3 개의 대응하는 서브그룹에서의 사망률은 각각 8.4%, 10.4% 및 16.1%였고; 표 3에 나타낸 바와 같이, rhNRG-1은 특히 NT-proBNP≤3000 fmol/mL 서브그룹에서 사망률을 상당히 낮출 수 있고, 이 서브그룹에서 여성 대상체는 등록된 여성 대상체의 75%를 차지한다는 것을 나타내었다.

[0089] 연구 209, 301 및 305의 개별 분석은 표 3에 나타낸 바와 같이, NRG-1 처치 그룹에서 여성 대상체의 사망률이 연구에서 NT-proBNP≤3000 fmol/mL 서브그룹에 대해 각각 0%, 0% 및 0%인 한편, 사망률이 대응하는 위약 그룹에서 21.4%, 8.3% 및 6.3%였다는 것을 드러냈다.

[0090] 남성 환자에 대해, NT-proBNP≤4000 fmol/mL 또는 NT-proBNP≤3000 fmol/mL 서브그룹에서, 일부 임상 연구는 rhNRG-1 처치 그룹이 위약 그룹에서의 것에 비해 우수한 사망률을 가졌다는 것을 나타내었다. 더욱 바람직하게

는, 연구 209, 301 및 305에서 NT-proBNP≤1600 fmol/mL인 남성 대상체의 풀링된 분석은 rhNRG-1 처치 그룹에서 사망률이 위약 그룹에서의 것에 비해 실질적으로 낮았다는 것을 드러냈다(2.6% 대 5.6%). 이 감소는 양측 성별의 모든 대상체의 종합 분석에 의거한 것이었다.

표 3. 전-원인 사망률 - 여성 서브그룹 분석의 요약: (연구 209/301/305 로부터의 데이터의 풀링된 분석 및 개별 분석)

전-원인 사망률	기준선 NT-proBNP (fmol/ml)	NT-proBNP 값-기반 여성 서브그룹	
임상 연구		rhNRG-1 n/N (%)	위약 n/N (%)
	≤1600	0/12 (0.0)	3/20 (15.0)
209	≤3000	0/16 (0.0)	6/28 (21.4)
	전부	4/33 (12.1)	11/38 (28.9)
	≤1600	0/16 (0.0)	2/20 (10.0)
301	≤3000	0/33 (0.0)	2/24 (8.3)
	전부	2/46 (4.3)	4/31 (12.9)
	≤1600	0/53 (0.0)	2/43 (4.7)
305	≤3000	0/69 (0.0)	4/63 (6.3)
	전부	6/89 (6.7)	9/80 (11.3)
	≤1600	0/81 (0.0)	7/83 (8.4)
209,301&305	≤3000	0/118 (0.0)	12/115 (10.4)
	전부	12/168 (7.1)	24/149 (16.1)

[0091]

[0092] 상기 분석을 고려하여, 3 개의 임상 연구 중 임의의 것에서 NT-proBNP≤3000 fmol/mL를 갖는 여성 대상체 및 NT-proBNP≤1600 fmol/mL를 갖는 남성 대상체의 개별 및 풀링된 분석을 표 4에 나타낸 바와 같이 수행하였다. 이들 풀링된 남성 및 여성 대상체에 대해, rhNRG-1 처치 그룹에서의 사망률 개선 결과는 위약 그룹에서의 것에 비해 상당히 우세하였다.

표 4. 전-원인 사망률 - 서브그룹 분석의 요약: (연구 209/301/305 로부터의 데이터의 풀링된 분석 및 개별 분석)

전-원인 사망률	여성 NT-proBNP≤3000 & 남성 NT-proBNP ≤ 1600 fmol/ml	
임상 연구	rhNRG-1 n/N (%)	위약 n/N (%)
209	1/72 (1.4)	10/91 (11.0)
301	1/106 (0.9)	2/63 (3.2)
305	5/208 (2.4)	14/210 (6.7)
209, 301&305	7/386 (1.8)	26/364 (7.1)

[0093]

[0094] 상기 열거된 실시양태는 연구의 보호 범위를 제한하지 않을 것이다. 통상의 기술자는 발명의 목적 및 범위로부터의 편차 없이 본 발명을 조정하고 변형할 수 있다. 따라서, 본 발명의 보호 범위는 구체적 실시양태에 의하기보다는 권리 및 요건에 따라 정의되어야 한다.

서 열 목 록

<110> ZENSUN (SHANGHAI) SCIENCE & TECHNOLOGY, CO., LTD.

<120> Method for Preventing, Treating or Delaying Heart Failure by using Neuregulin, and Compositions

<160> 1

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 61

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
20 25 30

Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
35 40 45

Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln
50 55 60