



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0112608
(43) 공개일자 2023년07월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 33/26 (2006.01) A61K 31/555 (2006.01)
A61K 33/243 (2019.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 33/26 (2013.01)
A61K 31/555 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7011800
- (22) 출원일자(국제) 2021년09월13일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년04월06일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2021/050064
- (87) 국제공개번호 WO 2022/056378
국제공개일자 2022년03월17일
- (30) 우선권주장
62/706,829 2020년09월11일 미국(US)
63/158,803 2021년03월09일 미국(US)
- (71) 출원인
레니버스 테라퓨틱스, 인크.
미국 76092 텍사스 사우스레이크 스위트 225 그랜
드 애비뉴 181
- (72) 발명자
카이저, 도널드
미국 76092 텍사스주 사우스레이크 원덤 힐 라인
1216
길렘, 알바로
미국 76226 텍사스주 란타 라스롭 스트리트 727
제이저, 리차드
미국 98109 워싱턴주 시애틀 제이2-302 페어뷰 애
비뉴 1100
- (74) 대리인
양영준, 이상남

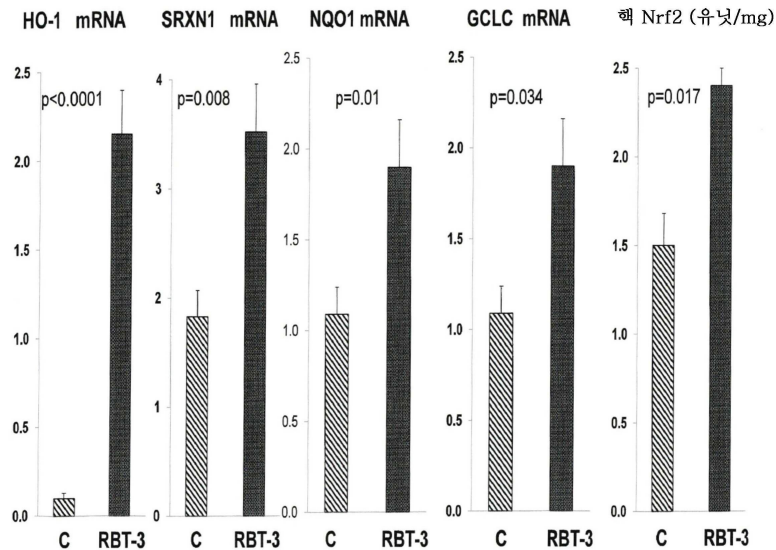
전체 청구항 수 : 총 52 항

(54) 발명의 명칭 신장 보호와 함께 암을 치료하는 방법

(57) 요약

본 발명은, 화학요법제의 세포독성에 대해 환자의 신장을 보호하기에 충분한 양의 철 수크로스 및/또는 주석 프 로토포르피린과 같은 프로토포르피린의 공-투여를 포함하는 암의 신규 치료 방법을 포함한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 33/243 (2022.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 13/12 (2018.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

명세서

청구범위

청구항 1

암 화학요법 동안 신장을 보호하는 방법으로서:

화학요법제 및 일정량의 철 조성물을 인간 환자에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 일정량의 철 조성물은 화학요법제의 세포독성 효과에 대해 환자의 신장을 보호하는 것인 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 화학요법제가 베마시주맙, 겐시타빈, IFN 요법, 시스플라틴, 이포스파미드, 페메트렉세드, 세특시맙 또는 메토티렉세이트, 또는 그의 조합인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 화학요법제가 시스플라틴인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 환자에서 헵시딘의 증가를 유도하는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 철 조성물이 철 수크로스 조성물인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 철 수크로스 조성물이 중탄산염을 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 철 수크로스 조성물이 대략 1-10%의 Fe²⁺/Fe³⁺ 비, 5-19 mg/ml의 총 철 함량, 4-11%의 유기 탄소 함량, 1100-1600 mOsm/Kg의 오스몰랄농도, 약 1-3nm의 철 코어 크기, 0.8%-3%의 Na 함량, 및 10,000-30,000 달톤의 평균 분자량을 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 철 수크로스 조성물이 대략 3-4%의 Fe²⁺/Fe³⁺ 비, 10-15 mg/ml의 총 철 함량, 6-9%의 유기 탄소 함량, 1400-1580 mOsm/Kg의 오스몰랄농도, 약 2-2.8 nm의 철 코어 크기, 1%-2%의 Na 함량, 및 20,000-25,000 달톤의 평균 분자량을 포함하는 것인 방법.

청구항 9

제5항에 있어서, 철 수크로스 조성물이 대략 약 3.4%의 Fe²⁺/Fe³⁺ 비, 약 12 mg/ml의 총 철 함량, 약 7.7%의 유기 탄소 함량, 약 1540 mOsm/Kg의 오스몰랄농도, 약 2.39 nm의 철 코어 크기, 약 1.26%의 Na 함량, 및 약 23,881 달톤의 평균 분자량을 포함하는 것인 방법.

청구항 10

방사선조영 영상화 동안 신장을 보호하는 방법으로서:

방사선조영제 및 일정량의 철 조성물을 인간 환자에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 일정량의 철 수크로스는 방사선조영제의 세포독성 효과에 대해 환자의 신장을 보호하는 것인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 방사선조영제가 아이오딘-함유 방사선조영제인 방법.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 방사선조영제가 디아트리지오에이트, 메트리조에이트, 이온성 아이오탈라메이트, 이온성 아이옥사글레이트, 아이오파미돌, 아이오헥솔, 아이옥실란, 아이오프로미드, 아이오티사놀, 아이오베르솔, 가도펜테테이트, 가도베네이트, 가도디아미드, 가도테레이트, 가도테리돌, 가도부트롤 또는 가도엑세테이트, 또는 그의 조합인 방법.

청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 환자에서 헵시딘의 증가를 유도하는 방법.

청구항 14

제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 철 조성물이 철 수크로스 조성물을 포함하는 것인 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 철 수크로스 조성물이 중탄산염을 포함하는 것인 방법.

청구항 16

제14항에 있어서, 철 수크로스 조성물이 대략 1-10%의 Fe²⁺/Fe³⁺ 비, 5-19 mg/ml의 총 철 함량, 4-11%의 유기 탄소 함량, 1100-1600 mOsm/Kg의 오스몰랄농도, 약 1-3nm의 철 코어 크기, 0.8%-3%의 Na 함량, 및 10,000-30,000 달톤의 평균 분자량을 포함하는 것인 방법.

청구항 17

제14항에 있어서, 철 수크로스 조성물이 대략 3-4%의 Fe²⁺/Fe³⁺ 비, 10-15 mg/ml의 총 철 함량, 6-9%의 유기 탄소 함량, 1400-1580 mOsm/Kg의 오스몰랄농도, 약 2-2.8 nm의 철 코어 크기, 1%-2%의 Na 함량, 및 20,000-25,000 달톤의 평균 분자량을 포함하는 것인 방법.

청구항 18

제14항에 있어서, 철 수크로스 조성물이 대략 약 3.4%의 Fe²⁺/Fe³⁺ 비, 약 12 mg/ml의 총 철 함량, 약 7.7%의 유기 탄소 함량, 약 1540 mOsm/Kg의 오스몰랄농도, 약 2.39 nm의 철 코어 크기, 약 1.26%의 Na 함량, 및 약 23,881 달톤의 평균 분자량을 포함하는 것인 방법.

청구항 19

암 화학요법 동안 신장을 보호하는 방법으로서:

화학요법제 및 일정량의 프로토포르피린을 인간 환자에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 일정량의 프로토포르피린은 화학요법제의 세포독성 효과에 대해 환자의 신장을 보호하는 것인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 화학요법제가 베바시주맵, 겐시타빈, IFN 요법, 시스플라틴, 이포스파미드, 페메트렉세드, 세특시맵 또는 메토티렉세이트, 또는 그의 조합인 방법.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 화학요법제가 시스플라틴인 방법.

청구항 22

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 환자에서 헵시딘의 증가를 유도하는 방법.

청구항 23

제19항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 프로토포르피린이 금속 프로토포르피린인 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 금속 프로토포르피린 주석 프로토포르피린인 방법.

청구항 25

방사선조영 영상화 동안 신장을 보호하는 방법으로서:

방사선조영제 및 일정량의 프로토포르피린을 인간 환자에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 일정량의 프로토포르피린은 방사선조영제의 세포독성 효과에 대해 환자의 신장을 보호하는 것인 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 방사선조영제가 아이오딘-함유 방사선조영제인 방법.

청구항 27

제25항 또는 제26항에 있어서, 방사선조영제가 디아트리조에이트, 메트리조에이트, 이온성 아이오타라메이트, 이온성 아이옥사글레이트, 아이오파미돌, 아이오헉솔, 아이옥실란, 아이오프로미드, 아이오티사놀, 아이오베르솔, 가도펜테에이트, 가도베네이트, 가도디아미드, 가도테레이트, 가도테리돌, 가도부트롤 또는 가도엑세테이트, 또는 그의 조합인 방법.

청구항 28

제25항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 환자에서 헵시딘의 증가를 유도하는 방법.

청구항 29

제25항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 프로토포르피린이 금속 프로토포르피린인 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 금속 프로토포르피린이 주석 프로토포르피린인 방법.

청구항 31

암 화학요법 동안 신장을 보호하는 방법으로서:

화학요법제 및 일정량의 프로토포르피린 및 일정량의 철 조성물을 인간 환자에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 일정량의 프로토포르피린 및 일정량의 철 조성물은 화학요법제의 세포독성 효과에 대해 환자의 신장을 보호하는 것인 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 화학요법제가 베바시주맵, 겐시타빈, IFN 요법, 시스플라틴, 이포스파미드, 페메트렉세드, 세특시맵 또는 메토티렉세이트, 또는 그의 조합인 방법.

청구항 33

제31항 또는 제32항에 있어서, 화학요법제가 시스플라틴인 방법.

청구항 34

제31항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 환자에서 헵시딘의 증가를 유도하는 방법.

청구항 35

제31항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 프로토포르피린이 금속 프로토포르피린인 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 금속 프로토포르피린이 주석 프로토포르피린인 방법.

청구항 37

제31항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 철 조성물이 철 수크로스 조성물인 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 철 수크로스가 중탄산염을 포함하는 것인 방법.

청구항 39

제37항에 있어서, 철 수크로스 조성물이 대략 1-10%의 Fe²⁺/Fe³⁺ 비, 5-19 mg/ml의 총 철 함량, 4-11%의 유기 탄소 함량, 1100-1600 mOsm/Kg의 오스몰랄농도, 약 1-3nm의 철 코어 크기, 0.8%-3%의 Na 함량, 및 10,000-30,000 달톤의 평균 분자량을 포함하는 것인 방법.

청구항 40

제37항에 있어서, 철 수크로스 조성물이 대략 3-4%의 Fe²⁺/Fe³⁺ 비, 10-15 mg/ml의 총 철 함량, 6-9%의 유기 탄소 함량, 1400-1580 mOsm/Kg의 오스몰랄농도, 약 2-2.8 nm의 철 코어 크기, 1%-2%의 Na 함량, 및 20,000-25,000 달톤의 평균 분자량을 포함하는 것인 방법.

청구항 41

제37항에 있어서, 철 수크로스 조성물이 대략 약 3.4%의 Fe²⁺/Fe³⁺ 비, 약 12 mg/ml의 총 철 함량, 약 7.7%의 유기 탄소 함량, 약 1540 mOsm/Kg의 오스몰랄농도, 약 2.39 nm의 철 코어 크기, 약 1.26%의 Na 함량, 및 약 23,881 달톤의 평균 분자량을 포함하는 것인 방법.

청구항 42

방사선조영 영상화 동안 신장을 보호하는 방법으로서:

방사선조영제 및 일정량의 프로토포르피린 및 일정량의 철 조성물을 인간 환자에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 일정량의 프로토포르피린 및 일정량의 철 조성물은 방사선조영제의 세포독성 효과에 대해 환자의 신장을 보호하는 것인 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 방사선조영제가 아이오딘-함유 방사선조영제인 방법.

청구항 44

제42항 또는 제43항에 있어서, 방사선조영제가 디아트리지오에이트, 메트리조에이트, 이온성 아이오타라메이트, 이온성 아이옥사글레이트, 아이오파미돌, 아이오헥솔, 아이옥실란, 아이오프로미드, 아이오디사놀, 아이오베르솔, 가도펜테테이트, 가도베네이트, 가도디아미드, 가도테레이트, 가도테리돌, 가도부트룰 또는 가도엑세테이트, 또는 그의 조합인 방법.

청구항 45

제42항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 환자에서 헵시딘의 증가를 유도하는 방법.

청구항 46

제42항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 프로토포르피린이 금속 프로토포르피린인 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 금속 프로토포르피린이 주석 프로토포르피린인 방법.

청구항 48

제42항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 철 조성물이 철 수크로스 조성물인 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 철 수크로스 조성물이 중탄산염을 포함하는 것인 방법.

청구항 50

제48항에 있어서, 철 수크로스 조성물이 대략 1-10%의 Fe²⁺/Fe³⁺ 비, 5-19 mg/ml의 총 철 함량, 4-11%의 유기 탄소 함량, 1100-1600 mOsm/Kg의 오스몰랄농도, 약 1-3nm의 철 코어 크기, 0.8%-3%의 Na 함량, 및 10,000-30,000 달톤의 평균 분자량을 포함하는 것인 방법.

청구항 51

제48항에 있어서, 철 수크로스 조성물이 대략 3-4%의 Fe²⁺/Fe³⁺ 비, 10-15 mg/ml의 총 철 함량, 6-9%의 유기 탄소 함량, 1400-1580 mOsm/Kg의 오스몰랄농도, 약 2-2.8 nm의 철 코어 크기, 1%-2%의 Na 함량, 및 20,000-25,000 달톤의 평균 분자량을 포함하는 것인 방법.

청구항 52

제48항에 있어서, 철 수크로스 조성물이 대략 약 3.4%의 Fe²⁺/Fe³⁺ 비, 약 12 mg/ml의 총 철 함량, 약 7.7%의 유기 탄소 함량, 약 1540 mOsm/Kg의 오스몰랄농도, 약 2.39 nm의 철 코어 크기, 약 1.26%의 Na 함량, 및 약 23,881 달톤의 평균 분자량을 포함하는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

배경 기술

[0001] 시스플라틴은 50년보다 더 이전에 그의 항암 활성이 발견된 이래로 통상적으로 사용되는 화학요법제이다. 현재, 시스-디아민 디클로로백금 II (시스플라틴)는 고환암, 난소암, 두경부암, 방광암 및 비소세포 폐암에 대한 항암제로서 임상적으로 널리 사용되고 있다. 그러나, 이는 신장에 집중적으로 축적되고 신장을 손상시켜, 심각한 독성 부작용을 유발하기 때문에, 시스플라틴의 사용은 제한되어 왔다.

[0002] 신장 보호는 FeS 및 SnPP의 투여를 통해 이전에 확인되었다. 미국 특허 번호 9,844,563 (Zager et al.)을 참조한다. 그러나, 화학요법 동안 신장 손상에 대해 효과적으로 보호하는 능력은 보호제가 종양 세포에 대한 화학요법제의 효능을 손상시키지 않는 선택적 보호를 필요로 한다. 화학요법 동안 사용하기 위한 효과적인 보호제를 개발하기 위해 추가의 연구가 필요하다.

발명의 내용

[0003] **도면의 설명**

[0004] 도 1은 RBT-3 (360 mg)이 인간 대상체에서 혈장 헵시딘 수준의 신속하고 현저한 증가를 유도한다는 것을 보여준다.

[0005] 도 2는 RBT-3 (240 mg)이 혈장 헵시딘 수준의 신속하고 현저한 증가를 유도한다는 것을 보여준다.

[0006] 도 3은 RBT-3 (120 mg)이 건강한 지원자 (HV) 및 CKD 대상체 모두에서 혈장 헵시딘 증가를 유도한다는 것을 보여준다.

[0007] 도 4는 기준선 값에 비해 혈장 헵시딘 수준의 증가를 보여준다.

[0008] 도 5는 Nrf2 경로가 CD-1 마우스에서 RBT-3 주사에 의해 활성화된다는 것을 보여준다.

[0009] 도 6a - 도 6b는 면역조직화학법에 의해 평가하였을 때, RBT-3이 마우스 근위 세관에서 헵 옥시게나제 1 (HO-1) 발현의 현저한 증가를 유도한다는 것을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0010] 본 발명은 암 세포에 대해 신장 및/또는 간을 선택적으로 보호하는 신장 보호제의 용도, 및 이러한 신장 보호제를 사용하면서 화학요법제를 사용하여 암을 치료하거나, 또는 방사선조영제를 사용하여 암을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다. 한 측면에서, 신장 보호제는 철 수크로스 (FeS)와 같은 철 조성물이다. 또 다른 측면에서, 신장 보호제는 프로토포르피린 (예를 들어, 주석 프로토포르피린, SnPP)이다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 암 화학요법 또는 방사선조영 영상화 동안 철 조성물과 프로토포르피린의 조합물을 투여하는 것을 포함한다. 예를 들어, 철 수크로스 및 주석 프로토포르피린을 화학요법제와 함께 투여한다.
- [0011] 본 발명은 철 조성물, 철 수크로스 예컨대 RBT-3을 이용하며, 이는 미국 특허 16/805,223에 기재되어 있다 (이는 발명의 명칭이 "NOVEL IRON COMPOSITIONS AND METHODS OF MAKING AND USING THE SAME"으로, 2020년 2월 20일에 출원되고, 2019년 2월 20일에 출원된 미국 가출원 62/812,028을 우선권 주장하며, 그의 개시내용은 그 전문이 본원에 포함된다). 프로토포르피린은 금속 포르피린, 예컨대 주석 프로토포르피린 (SnPP)을 포함한다. 철 프로토포르피린 IX의 다수의 합성 유사체가 공지되어 있다. 이들 화합물은 상업적으로 입수가 가능하고/거나 공지된 방법에 의해 용이하게 합성될 수 있다. 이들은, 예를 들어 백금, 아연, 니켈, 코발트, 구리, 은, 망가니즈, 크로뮴 및 주석 프로토포르피린 IX를 포함한다. 편의상, 이들 화합물은 총칭하여 Me-프로토포르피린 또는 MePP로 지칭될 수 있고, Me는 금속을 나타내며, 구체적으로는 금속에 대한 화학 기호를 이용함으로써 예컨대 크로뮴, 주석 및 아연 프로토포르피린 화합물의 경우 각각 Cr-프로토포르피린 (CrPP), Sn-프로토포르피린 (SnPP), Zn-프로토포르피린 (ZnPP)으로 지칭된다.
- [0012] 본 발명과 관련하여 사용될 수 있는 화학요법제는 시스플라틴, 뿐만 아니라 카르보플라틴, 엘록사틴 또는 옥살리플라틴을 포함한 백금 유사체의 부류 내의 화합물을 포함한다.
- [0013] **화학요법 동안 철 조성물의 신장 보호 효과**
- [0014] 헵시딘은 대식세포의 철 수준 및 염증유발 상태에 반응하여 간세포에서 우세하게 생산되는 널리 인식된 철 조절 단백질이다. Coffey R, Ganz T. Iron homeostasis: An anthropocentric perspective. *J Biol Chem.* 2017;292:12727-12734. 이는 처음에 항미생물 특성을 갖는 것으로 간주되었지만 (Michels K, Nemeth E, Ganz T, Mehrad B. Heparin and host defense against infectious diseases, *PLoS Pathog.* 2015;11(8):e1004998), 최근에는 급성 신장 보호 효과를 갖는 것으로 입증되었다. Van Swelm RP, Wetzels JF, Verweij VG, et al. Renal handling of circulating and renal-synthesized hepcidin and Its protective effects against hemoglobin-mediated kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27:2720-2732; Swaminathan S. Iron homeostasis pathways as therapeutic targets in acute kidney injury. *Nephron.* 2018;140:156-159; Scindia Y, Wlazlo E, Leeds J, et al. Protective role of hepcidin in polymicrobial sepsis and acute kidney injury. *Front Pharmacol.* 2019;10:615. Published 2019 Jun 6. doi:10.3389/fphar.2019.00615; Scindia Y, Dey P, Thirunagari A, Liping H, Rosin DL, Floris M, Mark D. Okusa MD, Swaminathan S. Heparin mitigates renal ischemia-reperfusion injury by modulating systemic iron homeostasis. *J Am Soc Nephrol.* 2015; 26: 2800-2814; Wang X, Zheng X, Zhang J, Zhao S, Wang Z, Wang F, Shang W, Barasch J, Qiu A. Physiological functions of ferroportin in the regulation of renal iron recycling and ischemic acute kidney injury. *Am J Physiol.* 2018;315: F1042-F1057. 예를 들어, 재조합 헵시딘 투여는 실험적 허혈성 AKI를 완화시키는 것으로 나타났다.
- [0015] 반대로, 헵시딘 결핍 마우스는 허혈성 신장 손상에 매우 취약하다 (6). 헵시딘이 그의 보호 작용을 발휘하는 메커니즘은 여전히 의심스럽다. 그러나, 대부분의 관심은 하기 잠재적 경로에 초점을 맞추었다 (6,7): i) 그의 작은 크기 (25 kDa)로 인해, 헵시딘은 신속한 사구체 여과, 이어서 근위 세관 세포내이입 흡수를 겪는다; ii) 헵시딘은 철 외수송체, 페로포틴에 결합하여, 그의 세포 재분포 및 후속 단백질분해적 파괴를 유발한다; iii) 페로포틴 손실은 세포내 축적 철 수준을 증가시킬 수 있다; 및 iv) 시토졸 철의 상승은 페리틴의 합성을 자극할 수 있으며, 이는 그의 널리 공지된 세포보호/항산화 효과를 부여한다. Johnson AC, Gooley T, Guillem Keyser JA, Rasmussen H, Singh B, Zager RA. Parenteral iron sucrose-induced renal preconditioning: differential ferritin heavy and light chain expression in plasma, urine, and internal organs. *Am J Physiol.* 2019;317: F1563-F1571; Zarjou A, Bolisetty S, Joseph R, et al. Proximal tubule H-ferritin mediates iron trafficking in acute kidney injury. *J Clin Invest.* 2013;123:4423-4434. 그러나, 추가의 보호 메커니즘이 또한 작동할 수 있다. 단지 한 예로서, 헵시딘과 세포보호 Nrf2 경로 사이의 상승작용적 상호작용이 존재할 수 있다 (10-13); Lim PJ, Duarte TL, Arezes J, et al. Nrf2 controls iron homeostasis in haemochromatosis and thalassaemia via Bmp6 and hepcidin. *Nat Metab.* 2019;1:519-531; Bayele HK, Balesaria S, Srini SK. Phytoestrogens modulate hepcidin expression by Nrf2: Implications for dietary

control of iron absorption. *Free Radic Biol Med.* 2015;89:1192-1202; Tanaka Y, Ikeda T, Yamamoto K, Ogawa H, Kamisako T. Dysregulated expression of fatty acid oxidation enzymes and iron-regulatory genes in livers of Nrf2-null mice. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012;27:1711-1717; Harada N, Kanayama M, Maruyama A, et al. Nrf2 regulates ferroportin 1-mediated iron efflux and counteracts lipopolysaccharide-induced ferroportin 1 mRNA suppression in macrophages. *Arch Biochem Biophys.* 2011;508:101-109.

[0016] 재조합 헵시딘이 AKI에 대한 신장 보호를 제공할 수 있다는 급증적인 증거를 고려해 볼 때, 본 발명자들은, 건강한 지원자 및 CKD 환자에게 투여되었을 때 신장 안정성이 입증된, 새로 개발된 신규 IV 철 수크로스 제제 (RBT-3)가 헵시딘 생산을 급성으로 자극할 수 있고, 이에 따라, 신장 헵시딘 수준을 증가시킬 수 있는지 여부에 의문을 가졌다. RBT-3은 미국 특허 출원 번호 16/805,223에 기재되어 있다 (이는 발명의 명칭이 "NOVEL IRON COMPOSITIONS AND METHODS OF MAKING AND USING THE SAME"으로, 2020년 2월 20일에 출원되고, 2019년 2월 20일에 출원된 미국 가출원 62/812,028을 우선권 주장하며, 그의 개시내용은 그 전문이 본원에 포함된다).

[0017] 이들 가능성을 탐구하기 위해, 본 발명자들은 건강한 지원자 (HV) 및 3-4기 CKD를 갖는 대상체에게 상이한 용량의 RBT3을 투여하고, 72시간 기간에 걸쳐 혈장 헵시딘 농도를 측정하였다. 소변 헵시딘 수준을 또한 검정하여 신장 헵시딘 전달을 확인하였다. 상보적 마우스 실험에서, 간 및 신장 피질 헵시딘 생산 둘 다에 대한 RBT-3의 잠재적 효과를 조사하였다. 헵시딘-Nrf2 상호작용에 대한 현재 관심을 고려하여, Nrf2 활성화에 대한 RBT-3의 영향을 평가하였다. 마지막으로, 임상적으로 관련된 AKI 모델에 대한 보호, 시스플라틴 신독성, 및 잠재적인 작용 메커니즘 제공에 대해 위해 RBT-3의 능력을 시험하였다. 이들 상보적 임상 및 실험 연구의 결과는 이 보고서의 기초를 형성한다.

[0018] 본 발명자들은 신장에 대한 화학요법의 세포독성 효과가 화학요법과 철 조성물의 공-투여에 의해 감소될 수 있다는 것을 발견하였다. 방사선조영제와 철 조성물의 공-투여는 또한 방사선조영제의 세포독성 효과를 감소시킬 수 있다. 철 조성물은 바람직하게는 철 수크로스 조성물이다. 철 수크로스 조성물은 바람직하게는 중탄산염을 포함하는 철 수크로스 조성물이다. 한 예에서, 철 수크로스 조성물은 RBT-3이다. 철 조성물은 하기 특징 중 하나 이상을 가질 수 있다: 대략 1-10%, 2-5%, 3-4% 또는 약 3.4%의 Fe²⁺/Fe³⁺ 비, 5-19 mg/ml, 8-18 mg/ml, 10-15 mg/ml, 또는 약 12 mg/ml의 총 철 함량, 및 4-11%, 6-9% 또는 약 7.7%의 유기 탄소 함량, 1100-1600 mOsm/Kg, 1400-1580 mOsm/Kg, 또는 약 1540 mOsm/Kg의 오스몰랄농도 및 약 1-3nm, 2-2.8 nm, 또는 약 2.39 nm의 철 코어 크기, 0.8%-3%, 1%-2%, 또는 약 1.26%의 Na 함량, 및 10,000-30,000 달톤, 20,000 -25,000 달톤, 또는 약 23,881 달톤의 평균 분자량.

[0019] 헵시딘은 전신 및 세포내 철 항상성의 주요 조절인자이고, 최근에 신세관 세포보호 효과를 보유하는 것으로 주목되었다. 이전에 논의된 바와 같이, 재조합 헵시딘 투여 후, 신장 여과, 근위 세관 흡수 및 페로포틴의 후속 분해가 일어난다. 페로포틴은 철의 유일한 공지된 세포 외수송체이기 때문에, 그의 분해는 근위 세관 철 함량을 증가시키는 것으로 여겨지며, 이는 이어서 페리틴 생산을 자극한다. 페리틴이 강력한 항산화제라는 것을 고려해 볼 때, 이는 헵시딘의 세포보호 효과의 핵심 매개체일 수 있다.

[0020] 이전에 보고된 2가지 마우스 연구에서, 본 발명자들의 실험실은, 베노퍼 FeS 투여 18-24시간 내에 다양한 형태의 AKI (글리세롤, 말레이이트 또는 허혈-재관류)에 대한 신장 보호가 발생한다는 것을 입증하였다. Johnson ACM, Zager RA. Mechanisms and consequences of oxidant-induced renal preconditioning: an Nrf2-dependent, P21-independent, anti-senescence pathway. *Nephrol Dial Transplant.* 2018;33:1927-1941; Johnson AC, Becker K, Zager RA. Parenteral iron formulations differentially affect MCP-1, HO-1, and NGAL gene expression and renal responses to injury. *Am J Physiol* 2010;299: F426-F435.

[0021] 본 발명자들은 이것이 부분적으로 근위 세관 페리틴 함량의 FeS-구동된 증가로 인한 것임을 시사하였다. Johnson AC, Gooley T, Guillem Keyser JA, Rasmussen H, Singh B, Zager RA. Parenteral iron sucrose-induced renal preconditioning: differential ferritin heavy and light chain expression in plasma, urine, and internal organs. *Am J Physiol.* 2019;317: F1563-F1571. 그러나, 베노퍼 FeS는 근위 세관 내강에 최소로 접근한다. Zager RA, Johnson AC, Hanson SY. Parenteral iron nephrotoxicity: potential mechanisms and consequences. *Kidney Int.* 2004;66: 144-156. 이는 FeS 구동 페리틴에 대한 대안적 가능성이 증가함을 시사한다: FeS는 간 헵시딘 합성을 자극할 수 있고, 이는 이어서 상기 언급된 경로에 의해 신장 페리틴 생산을 유발한다. 그러나, FeS가 빠르고 지속적인 헵시딘 생산 (즉, 24시간 기간 이내)을 유발할 수 있는지 여부, 예컨대 본 발명자들이 이전에 언급한 FeS-유도된 사전조건화 상태에 기여하는 것이 요구될지 여부는 여전히

히 불명확하다.

- [0022] 이 문제를 해결하기 위해, 본 발명자들은 건강한 인간 대상체 및 진행성 CKD를 갖는 환자에서 헵시딘 생산에 대한 신규 FeS, "RBT-3"의 영향을 평가하였다. RBT-3이 등물의 베노피보다 더 강력한 세포보호 작용을 유도한다는 본 발명자들의 실험실로부터의 예비 증거에 기초하여 본 발명자들은 연구를 위해 이 철 제제를 선택하였다. 추가적인 통찰을 얻기 위해, 정상 마우스에서 헵시딘 발현에 대한 RBT-3 효과를 평가하였다. 도 1-3에 나타난 바와 같이, 건강한 인간 및 CKD 대상체 양쪽 모두에서, RBT-3 주사 후 신속하고 용량 의존적인 혈장 헵시딘 증가가 관찰되었다. 이 반응은 24시간에 피크였으며, 두 대상체 군은 240 또는 360 mg RBT-3 주사에 반응하여 ~15배 혈장 헵시딘 증가를 나타내었다. 기준선에서, 혈장 헵시딘 수준은 건강한 지원자와 비교하여 CKD 대상체에서 상승되었으며, 이는 아마도 CKD의 염증유발 상태를 반영한 것일 것이다. Honda H, Hosaka N, Ganz T, Shibata T. Iron metabolism in chronic kidney disease patients. *Contrib Nephrol.* 2019;198:103-111; Weiss G, Ganz T, Goodnough LT. Anemia of inflammation. *Blood.* 2019;133: 40-50.
- [0023] 이는 CKD 환자에서 헵시딘 증가가 이미 최대였을 이론적 가능성을 증가시키므로, 추가 RBT-3 매개된 헵시딘 증가를 배제하였다. 그러나, 이는 기준선 값에 비해 절대 헵시딘 상승이 HV 및 CKD 연구 군에서 실질적으로 동일하다는 것을 고려하면 그러한 경우는 분명히 아니었다 (도 4). 흥미롭게도, 24 hr 피크 값은 RBT-3 주사 후 48-72 hr 내에 ~50% 감소하였다. 이는 아마도 감소하는 헵시딘 생산을 신속한 신장 헵시딘 흡수 및 소변 헵시딘 배설과 함께 반영한 것일 것이다. 실제로, 후자는 RBT-3 주사 24시간 후에 CKD 및 건강한 지원자 군 둘 다에서 소변 헵시딘 농도의 ~4배 증가에 의해 입증되었다.
- [0024] 철 로딩에 반응한 간 헵시딘 생산은 그의 간 수용체 (Tfr1, Trf2)에 대한 홀로트랜스페린 결합에 의해 개시되는, 증가된 유전자 전사로부터 독립적으로 발생하는 것으로 생각된다. 이어서, 후속 BMP-SMAD 경로 활성화는 HAMP1 유전자 전사를 상향조절한다. 이 경로가 RBT-3 주사에 의해 활성화되었음을 확인하기 위해, 본 발명자들은 RBT-3 투여 후 24시간에 마우스 간 및 신장 둘 다에서 HAMP1 mRNA를 측정하였다. 놀랍게도, 두 기관 모두에서 현저한 HAMP1 mRNA 증가가 관찰된 반면, 신장에서는 10배 더 큰 반응이 관찰되었다. 본 발명자들이 아는 한, Fe에 반응한 우선적인 신장 대 간 HAMP1 유도는 이전에 보고되지 않았다. 이는 FeS / RBT-3이 간접 (간 생산) 및 직접 (신장 유래) 메카니즘 둘 다에 의해 신장 헵시딘 로딩을 촉발할 수 있다는 흥미로운 가능성을 제기한다.
- [0025] FeS / RBT-3의 보호 작용의 범주에 대한 본 발명자들의 이해를 확장시키기 위해, 본 발명자들은 이제 그것이 실험적 시스플라틴-유도된 ARF에 대해 발현될 수 있는지 여부를 시험하였다. 이 모델은 연구를 위해 하기 4가지 고려사항을 고려하여 선택되었다: 먼저, 본 발명자들의 이전에 시험된 AKI 모델 (허혈, 말레에이트, 글리세롤-유도 횡문근용해)은 ~24시간 내에 완전히 명백한 것과 달리, 시스플라틴 신독성은 천천히 진전하여, 신부전의 완전한 발현을 위해 적어도 3일을 필요로 한다. 따라서, FeS / RBT-3 매개된 보호 효과가 이러한 연장된 시간 프레임에 걸쳐 발현될 수 있는지 여부는 불명확하였다. 둘째로, 시스플라틴 부가물은 이르고 현저한 DNA 손상 (예를 들어, DNA 가교)을 유도하여, 아포토시스성 또는 괴사성 세포 사멸로 귀결된다. Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanisms of cisplatin toxicity. *Toxins.* 2010; 11: 2490-2518.
- [0026] 이러한 독특한 손상-개시 사건을 고려하면, RBT-3이 여전히 보호 효과를 부여할 수 있는지 여부는 불명확하였다. 셋째로, 시스플라틴은 25-30% 임상 AKI 비율을 갖는, 널리 사용되는 화학요법제로 남아있다. Latcha S, Jaimes EA, Patil S, Glezerman IG, Mehta S, Flombaum CD. Long-term renal outcomes after cisplatin treatment. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016;11:1173-1179. 따라서, 시스플라틴 독성을 완화시키는 보호 메카니즘을 확인하는 것은 현재 충족되지 않은 의학적 필요를 채울 수 있다; 네 번째로, 시스플라틴 투여는 예정된 임상 사건이다. 따라서, RBT-3은 시스플라틴 주입 약 18-24시간 전에 투여될 수 있고, 이에 의해 FeS-매개된 세포저항성 상태의 완전한 발달에 필요한 시간을 허용한다. 실제로, RBT-3을 시스플라틴 주사 18시간 전에 마우스에게 투여한 경우에, 현저한 신장 보호가 관찰되었으며, 이는 BUN, 혈장 크레아티닌 및 혈장 NAG 농도의 급격한 감소에 의해 입증되었다 (표 3). 따라서, 이러한 발견들은 FeS / RBT-3 사전조건화가 광범위하며, 잠재적으로 임상적으로 적용가능한 신장 보호 효과를 발휘할 수 있다는 개념을 추가로 지지한다.
- [0027] RBT-3 사전조건화에 의해 유발된 완전히 예상치 못한 네번째 보호 작용은 신장 시스플라틴 흡수를 극적으로 억제하였다. 시스플라틴 신독성이 근위 세관 세포 흡수에 고도로 의존적이기 때문에, 관찰된 신장 피질 시스플라틴 수준의 40% 감소가 RBT-3의 보호 작용에서 우세한 역할을 하여야 한다. 근위 세관 세포 시스플라틴 흡수는 기저층 막에 위치한 유기 양이온 수송체 (예를 들어 OCT2, MATE1)를 통해 매개된다. OCT2 수송이 근위 세관 시스플라틴 흡수의 주요 결정인자이지만, MATE1 ("다중약물 및 독소 압출 단백질 1")이 또한 내강 시스플라틴 유

출을 유발할 수 있다는 것이 최근에 시사되었다 (24). RBT-3이 이들 세포 흡수 및 유출 경로에 어떻게 영향을 미치는지는 미지로 남아있다. 그러나, 헵시딘-MATE-1 상호작용이 근위 세관 시스플라틴 유출을 증가시킬 수 있다고 추측할 수 있다. Spreckelmeyer S, van der Zee M, Bertrand B, Bodio E, Stuerup S, Casini A. Relevance of copper and organic cation transporters in the activity and transport mechanisms of an anticancer cyclometallated gold(III) compound in comparison to cisplatin. *Front Chem.* 2018;6:377; Nieskens TTG, Peters JGP, Dabaghie D, et al. Expression of organic anion transporter 1 or 3 in human kidney proximal tubule cells reduces cisplatin sensitivity. *Drug Metab Dispos.* 2018;46: 592-599.

[0028] 다수의 이전 간행물에서, 본 발명자들의 실험실은 철 텍스트란, 철 글루코네이트, 베노퍼 및 페루목시톨을 비롯한 상이한 비경구 철 제제에 대한 신장 생물학적 반응에서 명백한 차이를 입증하였다. 이들 차이는 다양한 정도의 독성, 산화성 스트레스의 중증도, 및 잠재적 염증유발 효과를 포함한다. 가장 두드러지게는, FeS (베노퍼, 및 현재 RBT-3 둘 다)만이 신장 사전조건화 효과를 유도하는 것으로 나타났다. 실제로, 공개되지 않은 연구에서, 본 발명자들은 베노퍼 및 RBT3 양쪽 모두가 각각 글리세롤 AKI 모델을 완화시키지만, RBT-3이 대략 35% 더 큰 신장 보호 효과를 부여한다는 것을 발견하였다. 본 발명자들은 이제 RBT-3이, 베노퍼에 비해 5배 더 큰 RBT3에 대한 신장 HAMP1 반응을 유도한다는 것을 입증한다. 또한, RBT3은 베노퍼에 비해 신장 HO-1 mRNA 반응을 2배 유도하였다. 따라서, 베노퍼 및 RBT3은 명백하게 정량적으로 상이한 신장 세포보호 단백질 반응을 발휘한다. 베노퍼 대 RBT-3 사이의 어떤 물리화학적 차이(들)가 이들 차이를 설명하는 지는 미지로 남아있다. 그러나, 모든 Fe 제제가 유사한 것은 아니며, 이 때 RBT3이 가장 큰 세포보호 효과를 제공하는 것으로 보인다는 것을 이들 데이터가 명백하게 나타낸다.

[0029] 본 발명자들은 신장 헵시딘 로딩이 IV RBT-3 주사에 의해 현저하게 (15x) 및 신속하게 (<24시간) 유도될 수 있음을 입증하였다. 그러나, 헵시딘에 대한 그의 영향에 더하여, RBT-3은 재조합 헵시딘 주사에 의해 재현될 수 없는 추가의 보호 작용을 발휘한다는 것을 주목하여야 한다. 가장 유망한 것 중 2개는 다음과 같다: 1) 본 연구에서 처음으로 기록된, 근위 세관 내에서의 Nrf2 경로 활성화, 및 2) 적어도 시스플라틴의 경우에, 세관 신독소 흡수 (또는 축적)를 둔화시키는 RBT-3의 능력. 이러한 고려사항을 고려해 볼 때, RBT-3-유도된 사전조건화가 헵시딘 로딩 이상으로 다수의 세포 경로를 통해 매개된다는 것이 명백해 보인다. FeS가 인간에서 탁월한 임상 안전성 프로파일을 갖는 것으로 밝혀졌다는 것은, 그의 신장 보호/사전조건화 작용제로서의 잠재적인 임상적 가치를 추가로 시사한다. 마지막으로, 데이터는 모든 Fe 수크로스 제제가 동일한 생물학적 효과를 발휘하지는 않는다는 것을 확인시켜 준다. 지금까지 수집된 데이터에서, RBT3이 신장 사전조건화 상태를 유도하는데 가장 유망한 것으로 보인다.

[0030] **임상 연구**

[0031] 9명의 건강한 지원자 (HV; eGFR >70 ml/분/1.73 m²) 및 3-4기 CKD를 갖는 9명의 환자 (15-59 ml/분/1.73 m²)를 이 조사를 위해 모집하였다. 본 연구에 대한 기초를 형성한 대상체는 또한 중쇄 및 경쇄 페리틴 발현에 대한 FeS의 차등 효과를 평가한 이전 연구의 기초였다 (8). 연구는 아드바라(Advarra) IRB (메릴랜드주 콜럼비아)로부터 IRB 승인을 받았고, 각각의 대상체로부터 사전 동의를 얻었다. 연구는 헬싱키 선언에 따랐다. 배제 기준은 임신, CKD의 존재 이외의 임의의 유의한 의학적 질병, 이전 30일에서의 철 투여, 또는 >500 ng/ml의 혈장 페리틴 농도를 포함하였다. 2개의 연구군에 대한 구체적인 인구통계학적 데이터, eGFR 스크리닝 (CKD-EPI 방정식), BUN, 혈청 크레아티닌, 및 혈압을 표 1에 요약한다. 보다 상세한 정보는 이전에 제시되었다. Johnson AC, Gooley T, Guillem Keyser JA, Rasmussen H, Singh B, Zager RA. Parenteral iron sucrose-induced renal preconditioning: differential ferritin heavy and light chain expression in plasma, urine, and internal organs. *Am J Physiol.* 2019;317: F1563-F1571. 상기 시험은 Clinicaltrials.gov (NCT04072432)에 입력하였다.

[0032] 본 연구의 목적을 위해, 오레곤주 포틀랜드의 캐스케이드 커스텀 케미스트리(Cascade Custom Chemistry)에 의해 제조된 신규 FeS 제제, "RBT-3"가 사용되었다. RBT-3과 널리 사용되는 FeS 제제 "베노퍼(Venofer)" 사이에 다수의 물리화학적 차이가 존재한다 (미공개 데이터). 이들은 하기를 포함한다 (각각 RBT3 대 베노퍼): 더 낮은 Fe²⁺/Fe³⁺ 비; 3.4% 대 15.8%; 더 낮은 총 Fe 함량, 12 mg/ml 대 20 mg/ml; 더 낮은 유기 탄소 함량; 7.7% 대 12.14%; 더 낮은 오스몰랄농도 1540 대 1681 mOsm/Kg; 더 작은 철 코어 크기 2.39 대 3.88 nm; 더 높은 Na 함량 1.26% 대 0.5%; 및 더 낮은 평균 분자량 23,881 대 31,335 달톤. 이러한 구조적 차이에 더하여, RBT-3 및 베노퍼에 대한 선택된 생물학적 반응에서의 정량적 차이가 또한 주목되었다 (논의 참조).

[0033] HV 및 CKD 군을 각각 3개의 동일한 코호트 (각각 n, 3)로 나누었고, 각각의 코호트는 120, 240, 또는 360 mg의

RBT-3 (12 mg/ml 원액)을 받았다. RBT-3 용량 (원액 10, 20, 또는 30 ml)을 염수 100 ml와 2시간에 걸쳐 IV 주입하였다. 대상체를 연구 장소 (리버사이드 클리니컬 리서치(Riverside Clinical Research), 플로리다주 에지워터)에 밤새 남아 있게 하여 잠재적 유해 사건에 대해 스크리닝하였다. 정기에 헤파린 처리된 혈장 샘플을 기준선 (0) 및 4, 12, 24 및 72시간에 수집하였다. '스팟' 소변 샘플을 기준선 및 RBT-3 주입 24시간 후에 수득하였다. 상업적으로 입수가 가능한 ELISA (R & D 시스템즈; 미네소타주 미네아폴리스; 키트 # DY8307)를 사용하여 샘플을 헵시딘에 대해 이중으로 검정하였다. 소변 헵시딘 값은 소변 크레아티닌 농도에 의해 인자화되었다. ELISA 표준 곡선 샘플은 제조업체에 의해 제공되었다.

[0034] **마우스 실험**

[0035] 1. 마우스에서 RBT-3-유도된 헵시딘의 발현. 수컷 CD-1 마우스 (35-40 gms; 찰스 리버 랩스(Charles River Labs), 매사추세츠주 윌밍톤)를 본 기관의 IACUC에 의해 승인된 모든 동물 연구에 사용하였다. 마우스에게 꼬리 정맥을 통해 1 mg의 RBT-3 또는 비히클 (각각 n, 5)을 주사하였다. 18시간 후, 이를 펜토바르비탈 (40-50 mg/Kg)로 깊게 마취시키고, 복강을 개방하고, 대정맥으로부터 혈액 샘플을 수득한 다음, 신장 및 간을 신속하게 절제하고, 냉각시키고, 총 RNA 및 단백질을 추출하였다 (14). 신장 피질 및 간 헵시딘 (HAMP1) mRNA 수준을 하기 프라이머 쌍을 사용하여 경쟁적 RT-PCR에 의해 측정하였다: 좌측: cagcagaacagaaggcatga; 우측: agatgcagatggggaagtgtg. mRNA 값은 동시에 결정된 GAPDH 생성물에 의해 인자화되었다 (14). 혈장, 간 및 신장 피질 헵시딘 수준을 또한 ELISA에 의해 결정하였다 (14).

[0036] 2. RBT-3의 마우스 신장 Nrf2 발현에 대한 효과. RBT-3이 Nrf2 경로를 활성화시키는지 여부를 평가하기 위해, 헵시딘에 대한 그의 효과에 더하여, 5마리의 대조군 및 5마리의 RBT-3 처리된 마우스의 신장 샘플을 주사 4시간 후에 수집하였다. 이전에 기재된 바와 같이, 총 mRNA를 추출하고, 하기 4종의 Nrf2 활성화된 유전자에 대해 RT-PCR에 의해 검정하였다: 1) 헵 옥시게나제 1 (HO-1); 2) NAD(P)H 퀴논 데히드로게나제 1 (NQO1); 3) 슬피레 독신-1 (SRXN1); 및 4) 글루타메이트-시스테인-리가제-촉매 서브유닛 (GCLC) (15). 또한, 이 실험실에 의해 이전에 수행된 바와 같이, 핵 단백질을 추출하고 ELISA에 의해 Nrf2에 대해 검정함으로써 Nrf2 핵 전위를 평가하였다 (15).

[0037] 3. RBT-3의 근위 세관 HO-1 발현에 대한 효과의 면역조직화학법 분석. RBT3 매개 Nrf2 활성화가 근위 세관 세포에서 Nrf2 감수성 단백질 수준의 증가를 유발한다는 것을 확인하기 위해, RBT-3 또는 비히클 주사 18시간 후에 수득된 신장에서 HO-1 단백질 발현을 평가하였다. 포르말린-고정 파라핀-포매 조직을 양으로-하전된 슬라이드 상에서 4 마이크로미터로 절편화하고, 60°C에서 1시간 동안 베이킹하였다. 이어서, 슬라이드를 탈왁스시키고, 라이카 본드 Rx 염색기 (라이카, 일리노이주 버팔로 그로브) 상에서 염색하였는데, 이때 탈왁스 (테왁스 용액(Dewax Solution)), 항원 복원 (에피토프 복원 용액(Epitope Retrieval Solution) 2), 및 각각의 단계 후의 세정 (본드 워시 용액(Bond Wash Solution))을 위해 라이카 본드(Leica Bond) 시약을 사용하였다. 항원 복원은 20분 동안 100°C에서 수행되었고, 모든 다른 단계는 주변 온도에서 수행되었다. 내인성 퍼옥시다제를 3% H2O2로 5분 동안 차단한 후, TCT 완충제 (0.05M 트리스, 0.15M NaCl, 0.25% 카세인, 0.1% 트윈 20, 0.05% 프로클린300 pH 7.6)로 10분 동안 단백질을 차단하였다. 1차 항체, HO-1 (압캄 ab189491)을 60분 동안 적용하고, 이어서 라이카 항-토끼 HRP 중합체를 10분 동안 적용하고, 3차 TSA-증폭 시약 (1:100의 퍼킨엘머 OPAL 650)을 10분 동안 적용하였다. 슬라이드를 염색기로부터 제거하고, DAPI로 5분 동안 염색하고, 행구고, 프롤롱 골드 안티페이드 시약 (인비트로젠/라이프 테크놀로지스, 뉴욕주 그랜드 아일랜드)과 함께 커버슬립으로 덮었다.

[0038] 4. 시스플라틴 신독성 및 신장 시스플라틴 흡수에 대한 RBT-3 사전조건화의 영향. 꼬리 정맥을 통해 마우스에 1 mg RBT-3 또는 염수 비히클을 주사하였다 (각각 n, 5). 18시간 후, 모든 마우스에 시스플라틴 (15 mg/Kg; IP)을 주사하였다. 식품 및 물을 자유롭게 전반에 걸쳐 제공하였다. 주사 3일 후에, 마우스를 펜토바르비탈 (50 mg/Kg IP)로 깊게 마취시키고, BUN 및 크레아티닌 농도에 대해 혈액 샘플을 하대정맥으로부터 수득하였다. 근위 세관 효소인 N-아세틸 글루코사미다제 ("NAG")의 혈장 수준을 또한 평가하였다 (바이오어세이 시스템즈 #DNAG-100; 캘리포니아주 헤이워드). 또한, 신장 피질 추출물을 증류수 중에서 제조하고, 제조업체의 지침에 따라 시스플라틴 농도를 결정하였다 (프로폴딘; 괴팅겐(Goettingen), 독일).

[0039] 5. RBT3과 베노퍼 사이의 비교. 구조적 차이 이외에, RBT3과 베노퍼 사이의 기능적 차이를 입증하기 위해, 본 발명자들은 두 철 수크로스 제제 사이의 헵시딘 mRNA 및 HO-1 mRNA 반응을 비교하였다. 6마리의 마우스에게 1 mg의 RBT3 또는 베노퍼를 주사하고, 24시간 후에, 간 및 신장 mRNA 샘플을 수득하였다. 6개의 정상 샘플이 대조군 값을 제공하였다.

[0040] 통계. 각각의 샘플을 이중으로 검정하였고, 평균을 데이터 제시 및 분석에 사용하였다. 인간 헵시딘 데이터

는 평균 ± 1SD로 제시된다. HV 및 CKD 군에 대한 기준선 혈장 헵시딘 값을 독립표본 스튜던트 t 검정에 의해 비교하였다. 시간 경과에 따른 헵시딘 수준의 비교는 95% 신뢰 구간을 제시하면서 반복 측정에 대해 ANOVA에 의해 분석하였다. 기준선 인구통계학적 데이터를 독립표본 스튜던트 t 검정에 의해 비교하였다. 마우스 데이터는 평균 ±1SEM으로 주어진다. 유의성은 <0.05의 p 값에 의해 판단하였다.

[0041] 기준선 대상체 정보. 연구 집단에 대해 선택된 인구통계는 이전에 상세히 제시되었다. 표 1은 개요를 제공한다.

[0042] **표 1. 건강한 대상체 및 3-4기 CKD를 갖는 대상체의 개관 (참고문헌 8로부터).**

군	성별	연령	중량	BP (수축기)	BP (확장기)	eGFR	BUN	PCr
HV (9)	66% 남성	52 ± 6	92 ± 10	125±6	80 ± 2	>70	14	1.0±0.2
CKD (9)	22% 남성	69 ± 4	94 ± 9	130±2	75 ± 7	38 ± 8	25	1.5±0.4
P 값		<0.001	0.71	0.43	0.18	<0.001	0.013	0.005

[0043]

[0044] **표 1 범례.** 본 연구의 기초를 형성한 9명의 건강한 지원자 (HV) 및 9명의 3-4기 CKD를 갖는 대상체의 기준선 특징. 평균 및 95% 신뢰 구간 범위 = 평균 ± 괄호 안의 수. P 값은 독립표본 스튜던트 t 검정에 의해 유도되었다.

[0045] CKD 대상체는 HV보다 유의하게 더 나이가 많았고, HV 군에 비교하여 CKD 남성의 수가 더 적었다. CKD 군에 대한 평균 eGFR은 38±8 ml/분/1.73 m² (>70 ml/분.1.73 m²인 HV 군의 값의 ~절반)였다. CKD 대상체에 대한 더 낮은 eGFR은 HV에서 나타난 것에 비해 상승된 기준선 및 혈장 크레아티닌 농도에 의해 명백해졌다.

[0046] **HV 및 CKD 대상체에서 기준선 및 RBT-3 이후 혈장 헵시딘 농도.** 문헌 (16,17)과 일치하게, CKD 대상체는 HV에 비해 상승된 기준선 혈장 헵시딘 수준을 가졌다. (각각 26±25 ng/ml 대 4±5 ng/ml; p= 0.001). 이는 아마도 CKD 연관 염증유발 상태 및 가능하게는 CKD-연관 GFR 감소로 인한 신장 헵시딘 클리어런스 감소를 반영하였을 것이다.

[0047] 모든 대상체는 RBT-3 주사에 반응하여 극적이고 용량 의존적인 혈장 헵시딘 증가를 나타내었다 (도 1-3). RBT-3 주사 후 4시간만큼 일찍 증가가 관찰되었고, 24시간에 피크 값에 도달하였다 (도 1-3). 240 및 360 mg 투여량의 경우, 24시간 혈장 헵시딘 수준은 그의 기준선 값보다 대략 15x 더 높았다. 24시간 후, 급속한 혈장 헵시딘 감소가 관찰되었다. 그러나, 최종 평가 시점 (72시간)에서, 기준선 값에 비해 ~2-4배 혈장 헵시딘 증가가 여전히 관찰되었다 (모든 군, p<0.001).

[0048] CKD가 증가된 기준선 헵시딘 수준과 연관되었다는 사실에도 불구하고, 이러한 증가는 RBT-3이 혈장 헵시딘 증가를 유발하는 정도에 영향을 미치지 않았다. 예를 들어, 대상체가 120, 240 또는 360 mg RBT-3 투여량을 투여받았는지 여부에 관계없이, HV 및 CKD 군은 기저 값에 비해 24시간 증가가 거의 동일하였다 (도 4).

[0049] **결과**

[0050] **RBT-3 주사에 반응한 인간 소변 헵시딘 농도.** 기준선에서, 소변 헵시딘 농도는 HV 군과 CKD 군 사이에서 유의하게 상이하지 않았다 (각각 47±36 대 51±72 ng/mg의 소변 크레아티닌). RBT-3 주사 후 24시간까지, 양쪽 군은 기준선 값에 비해 ~4x 소변 헵시딘 증가를 나타내었다 (HV, 219±104; 기준선 대비 p=0.04; CKD 176±93; 기준선 대비 p=0.014). 따라서, 이들 소변 증가는 증가된 순환 헵시딘의 여과 수준 또는 가능하게는 세관으로부터의 헵시딘 유출과 일치한다.

[0051] **마우스 실험.**

[0052] 1. 마우스 HAMP1 유전자 발현; RBT-3에 대한 혈장, 신장, 및 간 헵시딘 반응.

[0053] 기준선 마우스 간 HAMP1 mRNA 발현 (표 2)은 신장 피질에서 관찰된 것보다 대략 25x 더 컸으며, 이는 간이 헵시딘 생산이 우세한 부위라는 것과 일치한다 (1). 간 및 신장 둘 다는 각각 HAMP1 mRNA 증가로 RBT-3 주사에 반응하였지만, HAMP1 mRNA 증가의 정도는 간 대비 신장에서 극적으로 더 컸다 (10x배만큼). 그러나, 기준선 및 RBT-3 후 헵시딘 단백질 수준은 2개의 기관이 대등하였다 (기준선 값에 비해 ~5x 상승; 표 2 참조). 이들 증가는 RBT-3 유도된 혈장 헵시딘 수준의 대략 3배 증가와 상응하였다 (표 2).

[0054] 표 2. 대조군 조건 및 RBT-3 투여 18시간 후의 마우스 간, 신장 및 혈장에서의 헵시딘 발현.

군	간 HAMP1 mRNA	신장 HAMP1 mRNA	혈장 헵시딘 (ng/ml)	간 헵시딘 (ng/mg 단백질)	신장 헵시딘 (ng/mg 단백질)
대조군	27±4	0.9±0.2	359±53	2.0±0.3	1.4±0.1
RBT-3 후 24 hr	46±6	578±198	1057±178	6.2±0.4	6.6±1.5
P 값	=0.028	=0.01	<0.001	<0.001	<0.005

[0055]

[0056] 표 2 범례. 2개의 군은 군당 5마리의 마우스로 구성되었다. HAMP1 mRNA는 GAPDH에 의해 인자화된다. 값은 평균 ± 1 SEM이다. P 값은 독립표본 스튜던트 t 검정에 의해 유도되었다.

[0057] 2. RBT-3에 반응한 마우스 신장 피질 Nrf2 유전자 활성화. 4종의 시험된 Nrf2 반응성 유전자 각각은 RBT-3 주사 후에 그의 mRNA의 유의한 증가를 나타내었다 (도 5 참조). HO-1 mRNA가 대조군 수준에 비해 ~20배 증가한 점을 고려하면, 가장 반응성인 유전자는 HO-1인 것으로 보였다. 또한, 대조군과 비교하여 RBT-3 처리군에서 핵 Nrf2 단백질 수준의 유의한 증가가 관찰되었다 (p=0.017).

[0058] 3. HO-1 면역형광. 국소 근위 세관 HO-1 염색이 대조군 신장 조직에서 관찰되었다 (도 6). HO-1 염색의 정도 및 강도는 RBT-3 주사 후 18시간에 크게 증가하였다. 증가는 주로 근위 세관 세포에 국한되는 것으로 보였고, 이는 강한 세포질 염색을 나타내었다. RBT-3 주사에 반응하여 사구체 또는 수질 HO-1 염색의 명백한 증가는 관찰되지 않았다.

[0059] 4. 시스플라틴 신독성에 대한 RBT-3 효과. 시스플라틴 주사 후 3일에, 중증 신장 손상이 대조군 마우스에서 명백하였는데, 이는 현저한 BUN 및 혈장 크레아티닌 상승에 의해 나타난 바와 같다 (표 3). BUN 및 크레아티닌 수준에 의해 평가된 바와 같이, RBT-3 사전조건화는 시스플라틴-유도된 손상의 약 50% 감소를 야기하였다. 이러한 보호가 근위 세관 손상의 감소를 반영한다는 것은, 전신 순환으로의 NAG 방출의 거의 완전한 차단에 의해 나타내어진다 (표 3). 흥미롭게도, RBT-3 매개 보호는 신장 피질 시스플라틴 농도의 40% 감소와 연관된다 (그리고, 아마도 적어도 부분적으로 이에 기인한다) (표 3).

[0060] 표 3. 시스플라틴 유도된 AKI: RBT-3 사전조건화의 영향

군	BUN (mg/dl)	크레아티닌 (mg/dl)	혈장 NAG	조직 시스플라틴
시스플라틴	105±11	0.7±0.1	19.5±0.8	227±35
시스플라틴/ RBT-3	48 ± 5	0.43±0.03	9.8±1.2	142±9
P 값	0.001	0.001	=0.0025	0.048
정상 값	24±1	0.3±0.03	8.9±2.0	0

[0061]

[0062] 표 3 범례. 값은 평균 ± 1 SEM으로 제시된다. BUN 및 크레아티닌 값은 mg/dL이다. 혈장 NAG 값은 활성 단위/리터이다. 시스플라틴 값은 µg/g 조직 습윤 중량이다. 통계적 비교는 독립표본 스튜던트 t 검정에 의해 이루어졌다.

[0063] 5. 베노피와 RBT3 FeS 제제 사이의 비교. 간 및 신장 둘다 RBT-3의 주사 후 HAMP1 mRNA 값에서의 유의한 증가를 나타내었다. 그러나, 신장 HAMP1 mRNA에서의 증가는 RBT3에서 훨씬 더 컸다 (RBT-3 대 베노피에서 11x 대 2x 증가) (p=0.015; 표 4). 대조적으로, 철은 둘다 헵시딘 mRNA를 상승시킨 반면, 간에서 관찰된 헵시딘 단백질 농도는 베노피 대 RBT-3에서 차이가 없었다. 이는 신장 특이적 HAMP1의 증대된 반응을 나타낸다. HO-1 mRNA는 또한 신장 샘플에서 프로빙되었고, 증가는 베노피 처리에 비해 RBT3이 2배 높았다. 이들 데이터는 2개의 FeS 제제 사이의 생물학적 반응 차이를 명백하게 입증하였다.

[0064] 표 4. 베노퍼 FeS 대 RBT-3 FeS 사이의 비교

군	신장 HAMP1 mRNA	간 mRNA	신장 HO-1 mRNA
베노퍼	1.48 ± 0.5 (2.2x)	4.4 ± 0.3	2.2±0.3
RBT-3	7.31 ± 2.28 (11x)	4.8 ± 0.4	4.4±0.4
P 값	=0.015*	NS (0.48)	<0.025
정상 값	0.67 ± 0.02	2.9± 0.5	0.8±0.1

[0065]

[0066]

표 4 범례. 마우스에게 1 mg 베노퍼 FeS 또는 RBT-3 FeS를 주사한 후, 24시간 후에 HAMP1 mRNA 및 HO-1 mRNA를 평가하였다. 베노퍼에 의한 2.2배 증가에 비해 RBT-3은 HAMP1 (헵시딘) mRNA의 11배 증가를 유도하였다. RBT-3은 또한 베노퍼와 비교하여 HO-1 mRNA의 배가를 유도하였다. 로그 베이스 10 데이터 전환 후, P= 0.015. 비전환의 경우, p=0.037.

[0067]

도 1. RBT-3 (360 mg)은 인간 대상체에서 혈장 헵시딘 수준의 신속하고 현저한 증가를 유도한다. RBT-3 주사 (360 mg)의 4시간 내에, 혈장 헵시딘 증가가 관찰되었고, 24시간에 피크에 도달하였다 (~15x 기준선). 건강한 지원자 (HV) 및 CKD 코호트에서 거의 동일한 반응이 관찰되었다. HV 및 CKD 군에 대한 95% 신뢰 구간 (±)이 도면의 하단의 표에 주어진다. P 값은 반복 측정에 대한 ANOVA로부터 유도되었다. HV= 건강한 지원자; CKD= 만성 신장 질환.

[0068]

도 2. RBT-3 (240 mg)은 혈장 헵시딘 수준의 신속하고 현저한 증가를 유도한다. 360 mg 용량의 경우에서와 같이, 헵시딘 증가가 4시간에 관찰되었고, 24시간 시점에 피크에 도달하였다. CKD 군과 건강한 지원자 (HV) 군 사이에 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 건강한 지원자 (HV) 및 CKD 군에 대한 95% 신뢰 구간 (±)은 도면의 하단의 표에 주어진다. P 값은 반복 측정에 대한 ANOVA로부터 유도되었다.

[0069]

도 3. RBT-3 (120 mg)은 건강한 지원자 (HV) 및 CKD 대상체 둘 다에서 혈장 헵시딘 증가를 유도한다. CKD 대상체는 HV와 비교하여 72시간 기간에 걸쳐 혈장 헵시딘 수준이 더 높았다. 이는 아마도 CKD 군에서의 보다 높은 기준선 (출발) 헵시딘 수준을 반영한다 (본문 참조). 이는 360 mg, 240 mg 및 120 mg RBT-3 처리군 전반에 걸쳐 그러하였다 (본문 및 도 4의 우측 패널 참조).

[0070]

도 4. 기준선 값 대비 혈장 헵시딘 수준의 증가. 건강한 지원자 (HV; 우측 패널 참조)와 비교하여 CKD 코호트에서 기준선 혈장 헵시딘 수준이 상승하였기 때문에, 이들 기준선 값 대비 RBT-3-유도된 증가를 계산하였다 (24 시간 피크 값 - 기준선 값). 이는 CKD와 건강한 지원자의 헵시딘 반응 사이의 비교를 허용하였다. 명백한 바와 같이, HV 및 CKD 군은 각각의 철 용량에 따라 고도로 대등한 헵시딘 증가를 나타내었다. 값은 평균 ± 95% 신뢰 구간이다. 240 mg 및 360 mg RBT-3 용량은 대등한 헵시딘 증가를 유도하였으며, 이들 둘 다는 120 mg RBT-3 용량 군에서 관찰된 것보다 더 컸다.

[0071]

도 5. Nrf2 경로는 CD-1 마우스에서 RBT-3 주사에 의해 활성화된다. 마우스로의 RBT-3 주사 4시간 후에, 시험된 4종의 Nrf2 반응성 유전자 mRNA 각각의 유의한 증가가 관찰되었다 (동시에 연구된 대조군 마우스와 비교함). Nrf2 경로 활성화의 추가 증거는 핵 단백질 추출물에서 핵 Nrf2 단백질 결합의 증가가 발견된 것이었다. 헵 옥시게나제 1 (HO-1); NAD(P)H 퀸 데히드로게나제 1 (NQO1); 술폰레독신-1 (SRXN1); 및 글루타메이트-시스테인-리가제-촉매 서브유닛 (GCLC).

[0072]

도 6. RBT-3은 면역조직화학법에 의해 평가 시 마우스 근위 세관에서 헵 옥시게나제 1 (HO-1) 발현의 현저한 증가를 유도한다. 좌측 패널에 제시된 대조군 신장은 근위 세관 절편의 다양한 세포질 염색을 보여준다. 대조적으로, FeS 주사 18시간 후에 수거된 신장 (우측 패널)은 현저한, 거의 융합성의 근위 세관 HO-1 증가를 나타내었다. 대조적으로, 별표로 표시된 사구체에서는 증가된 HO-1 염색이 명백하지 않았다. 따라서, 이들 발견은 도 5에 표시된 HO-1 mRNA 변화가 i) 증가된 HO-1 단백질 수준, 및 ii) 이들 증가가 근위 세관 내에서 발생하였음을 반영한다는 것을 확인시켜 주었다.

[0073]

화학요법 동안 프로토포르피린의 신장 보호 효과

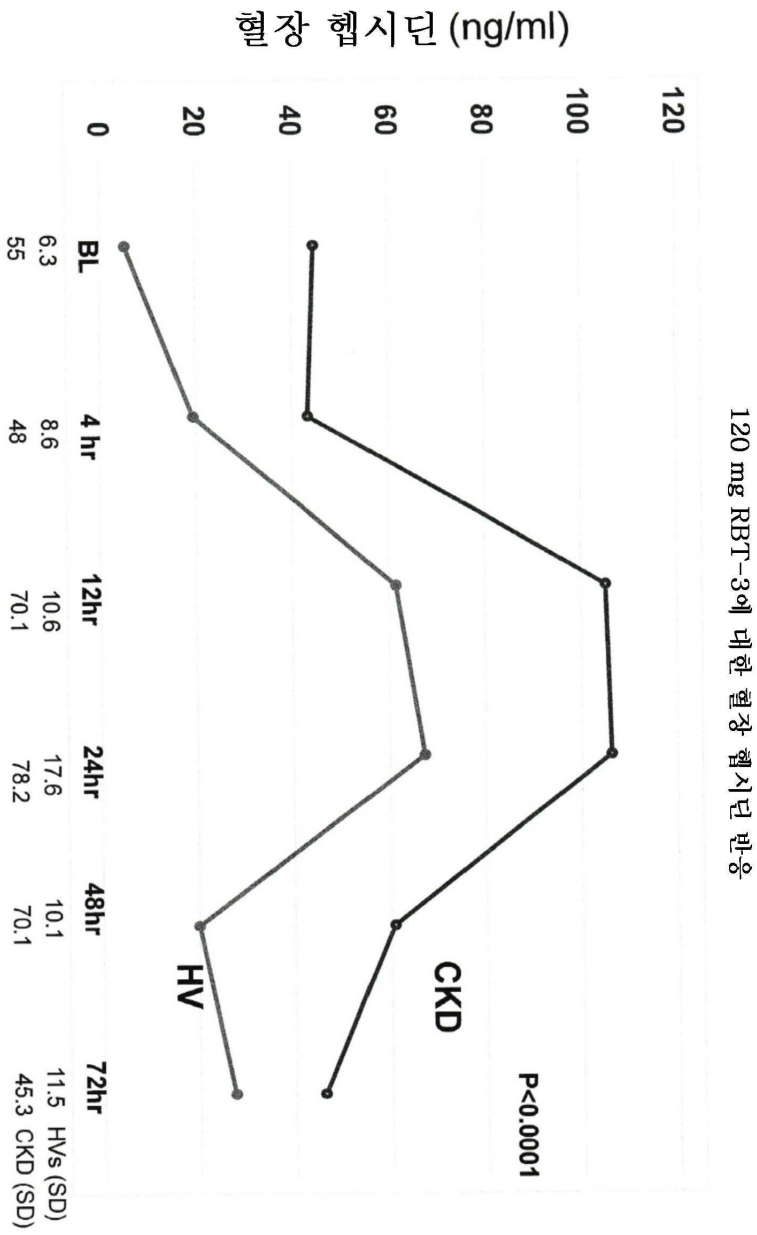
[0074] SnPP (1 umole) 또는 비히클 (V)을 제0일에 제공하고, 15 mg/kg의 시스플라틴을 제1일에 제공하고, BUN, 크레아티닌, 신장 피질 LDH, 및 NGAL, MCP-1, IL-6, HO-1, 및 p21에 대한 mRNA를 시스플라틴 주사 3일 후에 측정하였다. 시스플라틴 단독에 비해, SnPP는 모든 시스플라틴 처리된 마우스에서 통계적으로 유의한 보호를 부여하였다 (P<0.01).

군	BUN	P 크레아티닌	조직 LDH	NGAL mRNA	MCP-1 mRNA	IL-6 mRNA	HO-1 mRNA	P21 mRNAs
대조군	26±1	0.28±0.02	1000±29	0.03±0.0	0.31±0.05	0.01±0.0	.30±0.07	0.34±0.07
시스플라틴 (V)	103±22	0.94±0.41	754±54	16.9±12	10.9±5.7	2.51±1.65	1.16±0.28	4.23±0.61
SnPP/ 시스플라틴	30±3	0.32±0.01	890±20	0.88±0.25	1.38±0.16	0.07±0.02	0.56±0.03	2.1±0.17

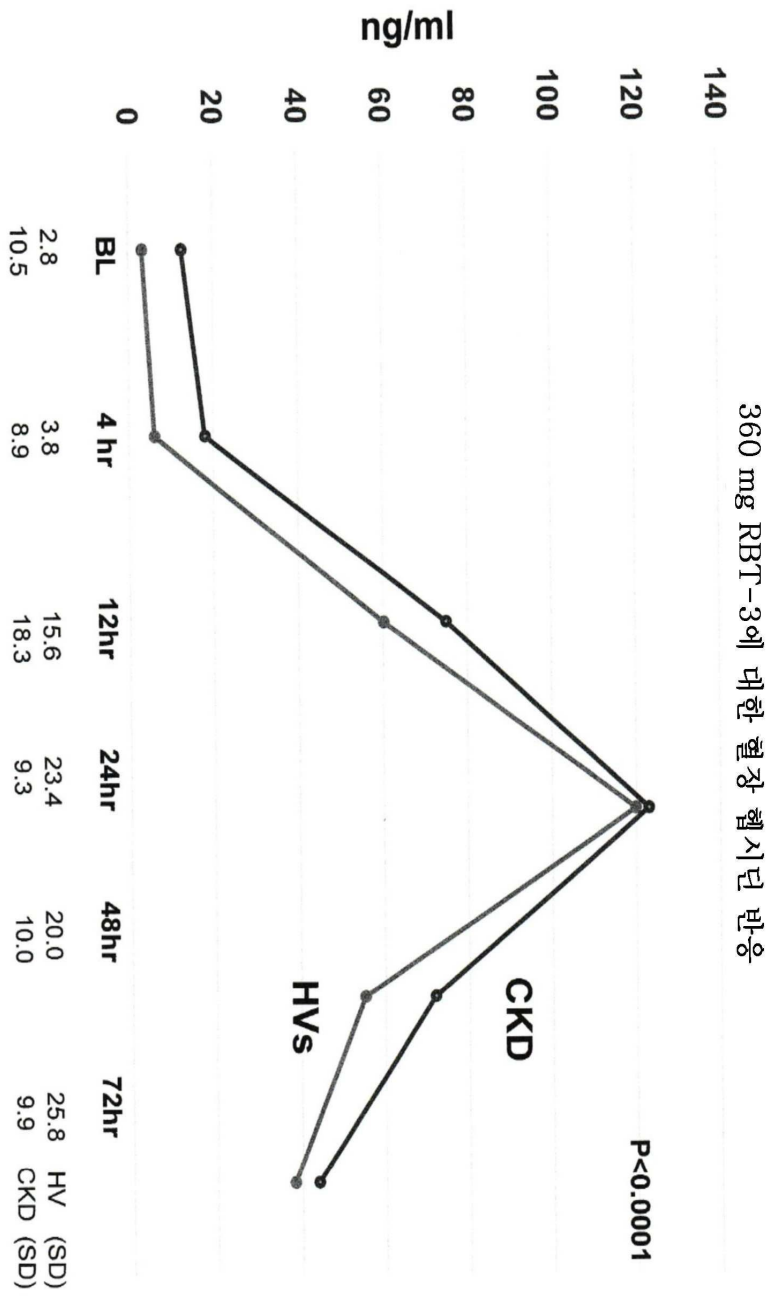
[0075]

[0076] 본 발명의 다른 실시양태 및 용도는 본원에 개시된 본 발명의 명세서 및 실시를 고려하여 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 모든 미국 및 외국 특허 및 특허 출원을 비롯한 본원에 인용된 모든 참고문헌은 구체적으로 및 전적으로 본원에 참조로 포함된다. 명세서 및 실시에는 단지 예시적인 것으로 간주되며, 본 발명의 진정한 범주 및 취지는 하기 청구범위에 의해 제시되는 것으로 의도된다.

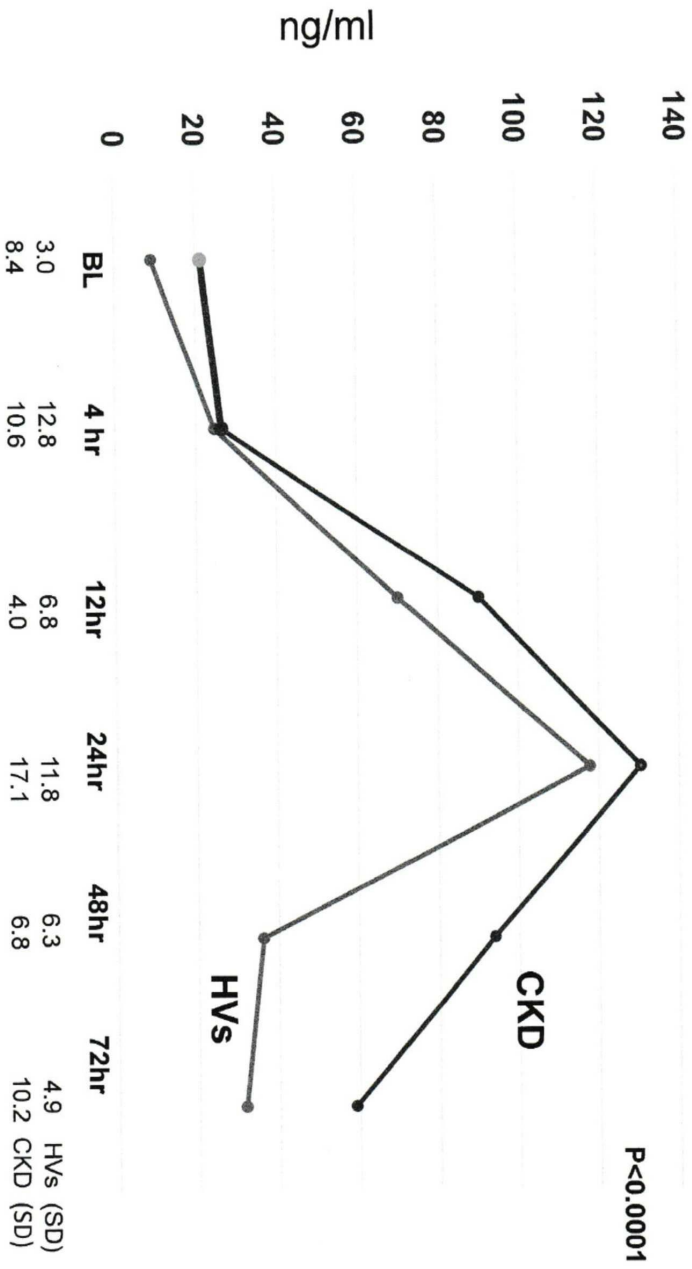
도면
도면1



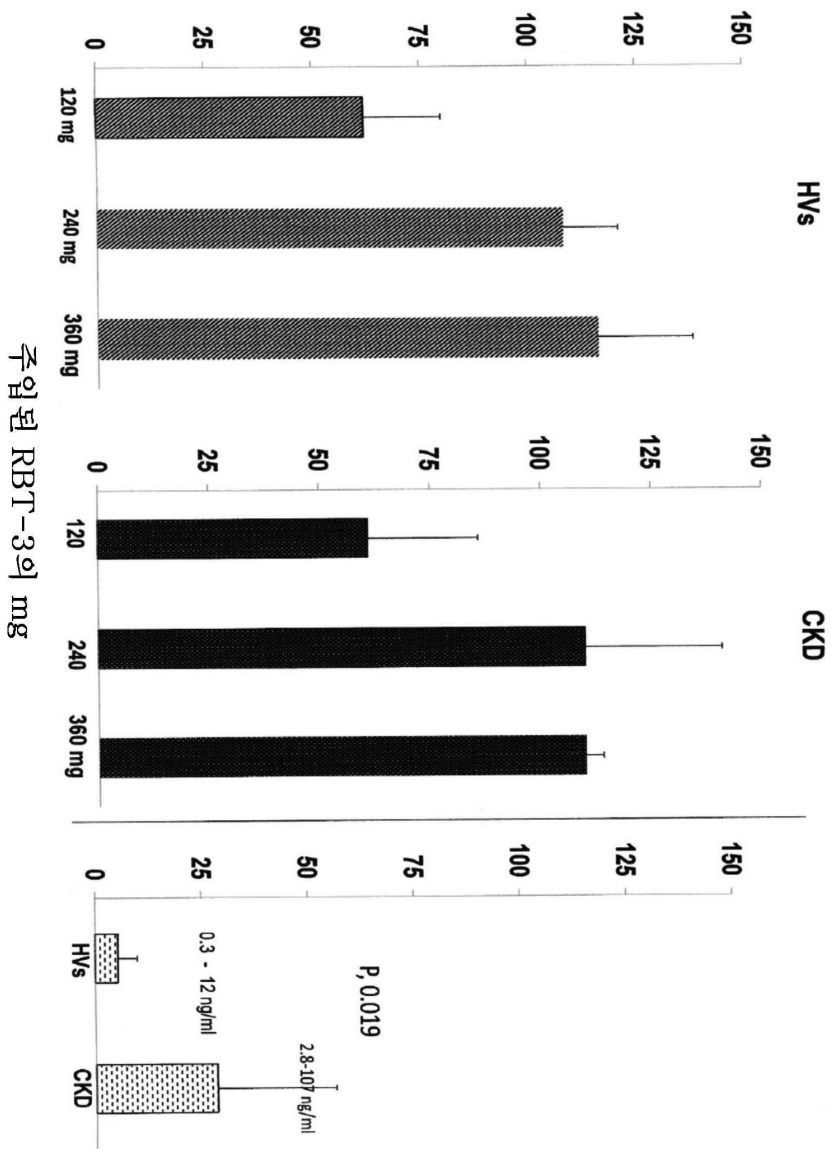
도면2



도면3

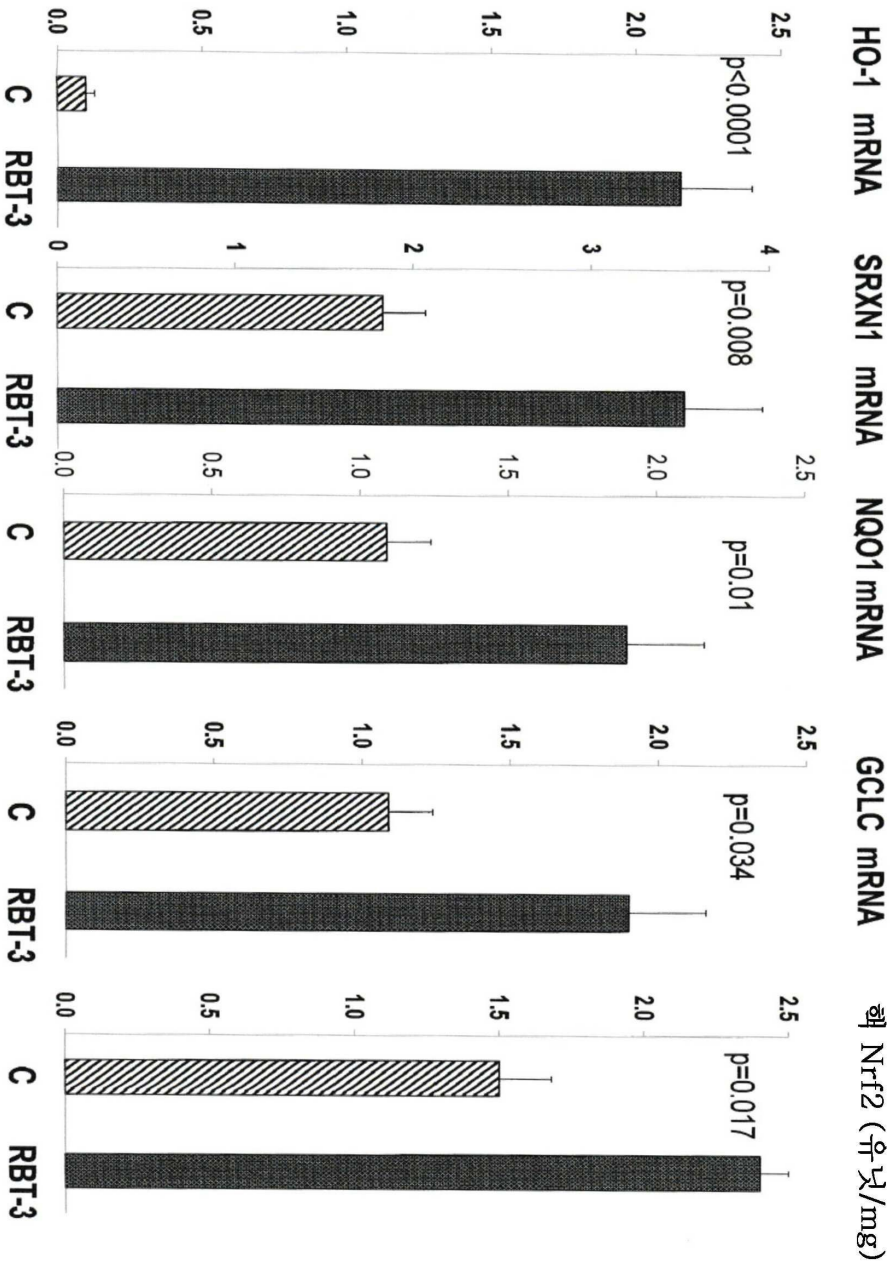


RBT-3 주입은 기준선 헵시딘에 비해 혈장 헵시딘의 증가를 유도했다

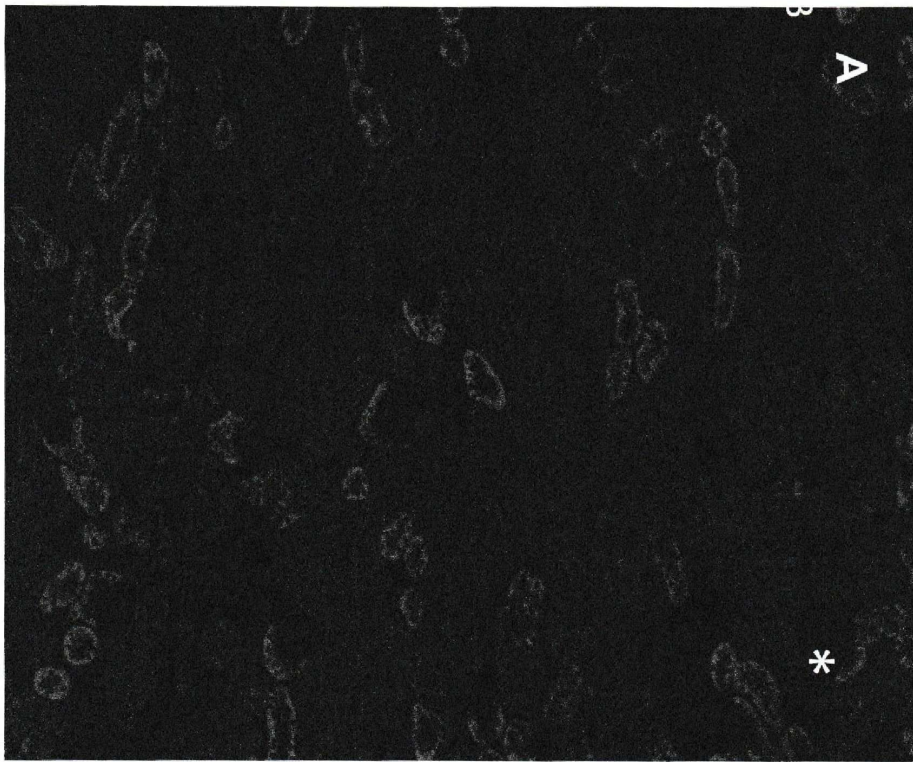


도면4

도면5



도면6a



도면6b

