



등록특허 10-2676274



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년06월18일

(11) 등록번호 10-2676274

(24) 등록일자 2024년06월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/30 (2015.01) A61P 25/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/30 (2013.01)

A61P 25/28 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2020-7007069

(22) 출원일자(국제) 2018년08월28일

심사청구일자 2021년08월10일

(85) 번역문제출일자 2020년03월10일

(65) 공개번호 10-2020-0045503

(43) 공개일자 2020년05월04일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/073106

(87) 국제공개번호 WO 2019/042983

국제공개일자 2019년03월07일

(30) 우선권주장

17188180.8 2017년08월28일

유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

Ning Chen 등, "Cerebrolysin for vascular dementia", Cochrane Database Syst. Rev., 제1호, 논문번호 CD008900 (2013. 1. 31.)

BMC Medicine, 제15권, 논문번호 41 (2017. 2. 24.)

Neurol. Sci., 제34권, 제4호, 제553-556면 (2012. 8. 10.)

(73) 특허권자

에버 뉴로 파르마 게엠베하

오스트리아 아-운터라흐 암 아테르세 오베르브루
가우 3

(72) 발명자

원터 스텔판

오스트리아, 4866 운터라흐 암 아테르세, 오베르
브루가우 3, 에버 뉴로 파르마 게엠베하 내
피슬러 허버트오스트리아, 5310 몬트제, 몬트제스트라쎄 34/3,
코마모 컨설팅 앤드 서비스 오게 내

(74) 대리인

특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 12 항

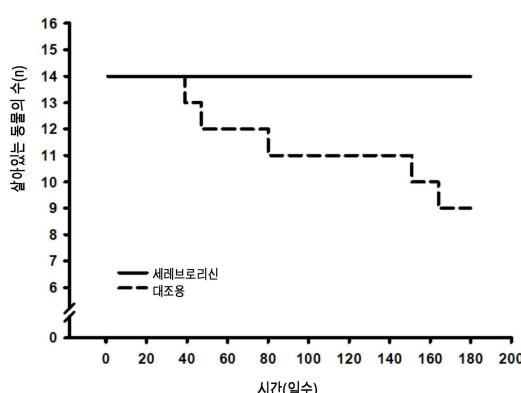
심사관 : 최승희

(54) 발명의 명칭 세레브로리신의 용도

(57) 요약

카다실(파질하 경색 및 백질뇌병증을 갖는 뇌 상염색체 우성 동맥병증) 환자에서 사망률을 감소시키는데 사용하기 위한 세레브로리신을 개시한다.

대 표 도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

세레브로리신(cerebrolysin)을 포함하는, 카다실(CADASIL) 환자에서 사망률(mortality) 감소에 사용하기 위한 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

카다실 환자가 Notch3 유전자의 돌연변이를 갖는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

수용액 중에 mL당 50 내지 1000 mg, 100 내지 500 mg, 또는 150 내지 250 mg의 세레브로리신 농축물을 함유하는 세레브로리신 제제인, 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

카다실 환자가, 21.5 내지 21,520 mg의 세레브로리신 농축물에 상응하는, 0.1 내지 10 mL 또는 1 내지 5 mL 범위의 세레브로리신 용량으로 치료되는, 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

카다실 환자가, 21.5 mg 내지 2152 mg의 세레브로리신 농축물에 상응하는, 0.1 내지 10 mL 또는 0.5 내지 5 mL의 근육내 투여 용량으로 치료되는, 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

카다실 환자가, 215.2 내지 21,520 mg의 세레브로리신 농축물에 상응하는, 0.1 내지 100 mL 또는 1 내지 50 mL의 정맥내 투여 용량으로 치료되는, 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

카다실 환자가, 연속적으로 주입되는 세레브로리신에 의해 치료되는, 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

주입이 5분 내지 4h, 10분 내지 2h, 또는 15 내지 60분의 주입 기간 동안 수행되고/되거나; 주입이 1 내지 100d, 5 내지 50d, 또는 10 내지 30d 동안 수행되는, 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

주입이 하루에 한 번 수행되는 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서,

주입이, 0.9% 염화 나트륨 용액, 링거액, 또는 5% 글루코스에 의한 세레브로리신의 희석에 의해 수행되는, 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

카다실 환자가, 수산화 나트륨을 함유하는 세레브로리신 제제로 치료되는, 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

카다실 환자가, 1 내지 6개월, 1 내지 3개월, 또는 2 내지 3개월의 무-치료 기간 후에 반복되는 치료 주기로 치료되는 조성물.

발명의 설명**기술 분야**

[0001]

본 발명은 카다실(CADASIL)의 치료에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

카다실(피질하 경색(subcortical infarct) 및 백질뇌병증(leukoencephalopathy)을 갖는 뇌 상염색체 우성 동맥 병증(cerebral autosomal dominant arteriopathy); 또는 카다실 증후군)은 재발성 피질하 허혈 사건 및 혈관성 치매를 포함한 핵심적인 특징을 갖고 신경-영상화시 미만성 백질 이상과 관련되는 망각을 동반하는 열공 증후군의 한 유형을 야기한다. 카다실은 상염색체 우성 방식으로 유전된다. 대부분의 병든 개인은 병든 부모가 있으며; 드노보(de novo) 병원성 변이는 드물게 나타난다. 병든 사람의 아이는 각각이 50%의 병원성 변이의 유전 및 질병 징후의 발생 위험이 있다. 가계 병원성 변이를 알고 있는 경우 증가된 위험의 임신 산전 검사 및 착상 전 유전자 진단이 가능하나; 전형적으로 성인-개시 질환의 산전 검사 요청은 통상적이지 않다. 병리학적 검사는, 주로 작은 뇌 동맥이 관련된 다수의 작은, 심부 뇌경색, 백질뇌병증, 및 비-죽상경화성, 비-아밀로이드 혈관병증(non-atherosclerotic, non-amyloid angiopathy)을 밝혀낸다. 혈관 평활근 세포의 심한 변경은 초미세 구조 분석상에서 자명하다. 돌연변이 유전자를 염색체 19에 대해 맵핑하였으며 인간 Notch3 유전자의 돌연변이가, 상기 유전자의 심각한 파괴를 야기하는 카다실 환자에서 식별되었다. 실제로, 카다실 환자 중 95% 이상이 Notch3의 병적인 미스센스 변이를 갖는다(Rutten et al., in: Pagon et al. (Eds.) GeneReviews[®] (2000; updated 2016); Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017; Joutel et al., Nature 383 (1996), 707-710). 카다실 환자에서 Notch3 돌연변이의 95% 이상이 미스센스 돌연변이인 반면에, 다른 것은 작은 인-프레임 결실 또는 이어맞추기-부위 돌연변이이다. 놀랍게도, 모든 병적인 돌연변이는 주어진 EGFR내에 홀수의 시스테인 잔기를 유도한다. 시스테인 잔기는 단백질의 구조 보전에 기여하는 것으로 여겨지며, 따라서 추가적인 또는 누락 시스테인 잔기가 올바른 단백질 폴딩을 훼손시키는 것이 가능하다. 드노보 돌연변이는 드물지만, 개별적인 사례가 보고되었다.

[0003]

카다실의 병적인 특징은 소동맥 매질 중 고전자밀도 과립, 및 동맥벽의 증가된 Notch3 염색에 의해 구성되며, 피부 생검에서 평가될 수 있다. 현재, 카다실에 대한 효능이 입증된 치료는 없다. 항혈소판 치료가 흔히 사용되나, 카다실에서 유효한 것으로 입증되지 않았다. 편두통이 발현의 빈도에 따라 정후학 및 예방학 모두에 의해 치료되어야 한다. 고혈압, 당뇨병 또는 고콜레스테롤혈증의 동시-발생이 치료되어야 한다. 지지 치료(실제적인 도움, 감정적인 지지, 및 카운셀링)가 병든 개인과 그의 가족에게 적합하다. 그러나, 뇌혈관 사고를 유발할 수 있는 혈관조영술 및 혈액응고 방지제와 같은 작용제는 피하는 것이 권장된다. 또한, 흡연이 허혈 사건의 위험을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 혈전용해 요법(정맥내 혈전용해)의 사용이 금기되는데, 그 이유는 뇌 출혈 위험의 증가가 추정되기 때문이다(Pagon et al., 2000; updated 2016).

[0004]

카다실에 대한 유효 치료를 입수할 수 없지만, 치료의 방향은 임상적인 발현을 완화시키는 가능한 질병 변형 전

략의 탐색을 향한다. 그러나, 지금까지는 단지 소수의 매우 예비적인 연구만이 보고되었다.

[0005] 입증되지 않은 사례는 또한 상기와 같은 편두통 치료에 나트륨 발프로에이트를 사용하였다. 아세틸콜린에스테라제 억제제는 인지 감퇴(18주 후 혈관성 치매 평가 척도)의 치료에서 1차 종점에는 유효하지 않지만, 전방-피질하 기능장애와 관련하여 약간의 개선이 관찰되는 것으로 보고되었다. 항혈소판 약물은 1차 및 2차 뇌졸중 예방에 대해 시험되었으나; 이들이 입증되지 않았고 논란이 일었다. 아세타졸아미드는 관류 MRI, 경두개 도플러 초음파 검사 및 Tc-99m 세포외 도메인 뇌 관류 SPECT에 의해 평가된 뇌관류의 증가에 대해 시험되었다. 더욱 또한, 상기는 아토바스타틴에 대한 편두통 공격의 빈도를 감소시킬 목적으로 편두통 예방에 사용되었으나, 경두개 도플러로 검사시, 뇌혈류에 대한 효과는 보고되지 않았다. L-아르기닌은 경두개 도플러로 검사시, 유도-혈관반응성을 나타내었다. 사프로프테린(24개월간 200 내지 400 mg bid)에 대한 최종 결과는, 1차 종점(반응성 충혈 지수의 평균 차이)의 경우, 말초 혈관반응성의 임의의 개선에 대해 유의미하지 않았다. 마우스 모델에서, 줄기세포 인자 및 과립구-콜로니 자극 인자의 조합이 카다실의 병적인 진행을 제한하는 것으로 보고되었다(모두 문헌[Di Donato et al., BMC Medicine (2017) 15:41]; [DOI 10.1186/s12916-017-0778-8]에서 리뷰되었다).

[0006] 혈관 위험 인자, 특히 흡연 및 고혈압이 있는 개인에서의 보다 중증인 질병 과정의 증거에 비추어, 혈관 위험 인자의 억제가 카다실 관리의 중요한 부분으로서 간주된다. 항혈소판 약물, 예를 들어 아스피린 또는 클로피도그렐의 사용에 관하여, 대부분의 신경과 전문의는 카디실 환자 치료시 산발적 뇌졸중에 사용되는 지침을 적용한다. 그러나, 상기 접근법의 적합성은 분명치 않다. 실제로, 상기 질병에서 허혈 사건의 혈전성 기원은 지금까지 입증되지 않았다. 다른 한편으로, 다수의 보고서는 상당 비율의 카다실 환자에서 미세출혈(소출혈)의 존재를 강조하였다. 이러한 이유로 인해, 상기 질병에서 항혈소판 약물의 안전성은 명확해져야 할 일이다. 유사하게, 혈전용해의 이들은 불명확하지만, 상기가 산발적 열공성 뇌졸중에 이득임이 제시되었다.

[0007] 도네페질에 의한 168명 환자에서의 다기관 시험에서, 혈관성 치매 평가 척도 - 인지 보조척도의 1차 결과에서 개선을 관찰할 수 없었다. 그러나, 집행 기능의 다수의 척도에 대한 개선이 주목되었지만, 이러한 발견의 임상적 관련성은 명확하지 않다. 카다실의 합병증, 예를 들어 우울증 및 편두통은 산발적 질병에 사용되는 치료와 유사한 치료에 반응하는 것으로 보인다(Di Donato et al., 2017). 혈관성 치매에 대해 세레브로리신(cerebrolysin)이 천(Chen) 등에 의해 리뷰되었다(Cochrane Database of System. Rev. 1 (2013): DOI: 10.1002/146 1858.CD008900.pub).

[0008] 카다실에 대한 특정 데이터의 부재하에서, 대부분의 신경과 전문의는 노령 환자, 예를 들어 40세 이상의 환자에서 허혈성 뇌졸중 후 2차 예방에 아스피린을 사용하지만, 그의 사용에 대한 찬성이나 반대의 증거는 없다. 상기 전략이 카다실에 적합한지의 여부는 분명치 않으며, 가능한 증가된 출혈 위험이 제공되는 경우 추가의 조사가 필요할 것이다. 명백한 적응증, 예를 들어 고위험 심방조동으로 인해 응고방지를 수행할 필요가 있는 환자는 제공된 뇌내출혈 위험 보고에 유의해서 따라야 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 따라서, 카다실 환자의 질병 증상 및 질병 진행을 다루기 위한 신규의 합리적인 치료학적 중재, 특히 각각 사망률을 감소시키거나 생존률을 상승시키는 치료학적 중재가 필요함은 자명하다.

과제의 해결 수단

[0010] 따라서, 본 발명은 카다실(피질하 경색 및 백질뇌병증을 갖는 뇌 상염색체 우성 동맥병증) 환자에서 사망률(mortality)을 감소시키는데 사용하기 위한 세레브로리신을 제공한다.

[0011] 세레브로리신(cerebrolysin)은 저분자량 웨티드(<10 kDa) 및 유리 아미노산을 포함하는, 뇌 단백질의 표준화된 효소적 파괴에 의해 생성되는 웨티드 제제이다.

[0012] 세레브로리신은 전임상 모델 및 치매 환자에서 행동 및 인지 장애를 개선시키고; 뇌졸중뿐만 아니라 TBI에서 운동 기능, 인지 성능 및 일상 활동을 개선시키는 신경영양-유사 성질을 갖는 웨티드 혼합물이다. 세레브로리신의 작용 방식은 감소된 흥분독성 및 유리 라디칼 형성과 같은 신경보호 성질에서부터 증가된 신경 가소성 및 신경생성을 통한 중대된 회복에 이르는 다기능적 방식이다.

[0013] 세레브로리신은 뇌졸중 및 혈관성 치매에 사용된다. 가능하게는 감소된 베타-아밀로이드 침착을 통한, 혈관성 치매가 있는 사람에서의 인지 기능에 이로운 효과가 보고되었다. 세레브로리신은 다수의 유럽 및 아시아 국가

에서 뇌출중 치료에 승인된다.

[0014] 놀랍게도, 본 발명에 의해, 세레브로리신이 카다실 환자의 사망률의 감소, 및 따라서 생존의 개선에 현저한 영향을 미치는 것이 관찰되었다. 백질 액포화에 대한 효과는 관찰되지 않았지만, 카다실의 특징(이는 본 발명을 훨씬 더 놀라운 것으로 만든다)인, 대단히 통계학적으로 유의수준인 사망률의 감소가 최첨단 카다실 마우스 모델의 세레브로리신 치료에 대해 입증되었다.

[0015] 상기 효과는 구체적으로, 선행의 간행물이 카다실 환자의 세포에서 산화 스트레스-유도된 세포사멸에 대한 세레브로리신의 시험관내 보호 효과가 존재하지 않음을 보고했다는 사실에 비추어 완전히 뜻밖이었다(Formichi et al., *Neurol. Sci.* 34 (2013), 553-556; doi: 10.1007/s10072-012-1174-y).

[0016] 상기 연구에서, 포르미치(Formichi) 등은 15명의 카다실 환자(34세 내지 70세 범위)의 말초 혈액 림프구(PBL), 및 전형적인 세포사멸-전 자극으로서 고도의 환원당인 2-데옥시-D-리보스(dRib)를 사용하였다. 세포사멸은 유식 세포측정 및 형광 현미경검사에 의해 분석되었다. 표준 조건하에서 배양된 카다실 환자로부터의 PBL에의 세레브로리신의 투여는 세포사멸 세포의 비율에 영향을 미치지 않았다. dRib와 함께 배양된 PBL에의 세레(Cere)의 투여는 단지 5명의 환자에서 48h의 배양 후에 세포사멸의 현저한 감소를 야기한 반면, 다른 10명의 환자에서 세레브로리신 치료는 세포사멸의 비율의 어떠한 현저한 차이와도 관련되지 않았다. 상기 결과는 카다실 환자의 단지 30%에서만 산화 스트레스-유도된 세포사멸에 대한 세레브로리신의 보호 효과를 보였다. 따라서, Notch3 유전자는 추정상 시험관내 세레브로리신의 세포사멸-방지 성질에 영향을 미치지 않는다는 결론이 내려졌다. 이는 또한 세레브로리신이 액포화에 영향이 없다는, 본 발명의 과정에서 획득된 결과를 설명할 수 있었다. 따라서, 어쨌든, 세레브로리신이 1차 매개변수 사망률에 영향을 미칠 수 있음을 완전히 뜻밖이었다.

[0017] 포르미치 등에 의해 획득된 결과에도 불구하고, 또 카다실 환자가 Notch3 유전자의 돌연변이를 갖는다는 사실에도 불구하고, 본 발명에 따른 효과를 획득하기 위해서 세레브로리신을 모든 카다실 환자의 치료에 유효하게 적용할 수 있다.

[0018] 카다실은 대개 유전학적으로, 바람직하게는 전체 Notch3 유전자의 서열분석에 의해 진단된다. NOTCH3 엑손 33 (단백질의 세포내 부분의 PEST 도메인을 암호화한다) 중의 이종접합성 절두 병원성 변체가 측부 수막 증후군(리먼 증후군)에서 기술되었다. 상기 병원성 변체는 Notch3 신호전달 기능의 획득을 통해 작용하는 것으로 추정되며, 카다실의 NOTCH3 병원성 변체와 별개이다. Notch3 엑손 25 병원성 변체(c.4556T>C, p.Leu1519Pro)는 상염색체 우성 유아근섬유종증에서 기술되었다.

[0019] 카다실 환자의 뇌자기공명영상(MRI)은 T1-가중 영상에서 저강도 및 T2-가중 영상에서 고강도를 보이며, 대개는 다양한 크기의 다수의 융합성 백질 병변을 특징으로 한다. 이들 병변은 기저핵, 측뇌실 백질 및 뇌교 주변에 집중되며, 빈스방거병에서 보이는 것들과 유사하다. 이들 백질 병변은 또한 돌연변이된 유전자를 갖는 무증상 개인에서도 보인다. MRI는 카다실의 진단에 사용되지 않지만, 심지어 증상 개시 수십 년 전의 백질 변화의 진행을 나타낼 수 있다.

[0020] 카다실 환자의 백질 변화는 종종 전방 측두엽, 외포 및 상전두회와 관련있다. 전방 측두극 변화는 질병에 대해 높은 민감도 및 특이성(각각에 대해 대략적으로 90%)을 갖는 것으로 나타났으며 진단에 유용하다. 아시아 집단에서, 전방 측두엽 관련은 덜 통상적이다. 외포 변화도 또한 높은 민감도(대략적으로 90%)를 갖지만, 특이성은 낮다(대략적으로 50%). 실제로, 최근의 체계적 분석은 카다실 및 산발적 SVD에서 외포의 유사한 연관성을 나타내었다. 산발적 SVD에서 드물게 발생하는 뇌량 신호 이상이 카다실에서 기술되며; 상기와 같은 이상은 또한 다발성 경화증의 특징인데, 이는 카다실을 다발성 경화증으로 오진하게 하는 하나의 이유이다. 점같은 저강도 병변과 함께 구배-에코 영상에 의해 나타나는 뇌 미세출혈이 가변적인 비율의 사례(30 내지 70%)에서 발생하며, 대개는 나이 및 위험 인자, 예를 들어 높은 혈압에 따라 증가하고, 뇌내출혈이 또한 다수의 환자, 특히 아시아 출신 환자에서 기술되었다(di Donato et al., 2017).

[0021] 카다실은 I67.8로서 분류된 ICD-10-CM 진단 코드("기타 명시된 뇌혈관 질병")이며, 피질하 질병으로서 정의되었으나, 고해상 영상화를 허용하는 고장 7-테슬라 MRI에 의한 최근의 연구는, 거의 대개 양쪽 반구의 대칭적인 패턴에 따르는 전두부 및 두정부에서의 피질 미세경색 및 조기 미만성 피질 변화의 증거를 포함하여, 피질의 1차적인 연관성을 검출하였다. 이러한 변화는 피질 얇아짐 또는 피질하 병변과 관련이 없었으며 정맥 혈관 밀도 또는 수초내 부종에 부차적인 것으로 가정되었다. 유사한 데이터가 또한 실험 모델에서 보고되었다. 더욱이, 피질하 변화는 부차적인 피질 변화를 유도할 수 있다. 종단적 연구에서, 장애 열공에 이어서 특이적으로, 결합된 뇌 영역에서 피질이 얇아졌다. 또 다른 최근의 발달은 조직 손상을 특성화하기 위한 확산 텐서 영상의 사용

이다. 카다실 환자에서 관찰된 확산 측량의 전형적인 변화는 분획성(확산 방향성에 대한 척도)의 감소 및 걸보기 확산 계수 또는 평균 확산도(확산 정도에 대한 척도)의 증가이다. 히스토그램 분석이 카다실-관련된 변화를 횡방향뿐만 아니라 종방향으로 측정하기 위한 민감성 도구로서 제안되었다(진단 및 감별 진단이 문헌[di Donato et al., 2017] 및 문헌[Rutten et al., 2000, updated 2016]에서 리뷰되었다).

[0022] 카다실 진단은 여전히 과소진단되는 것으로서 간주되지만, 최근 20년간 현저하게 개선되었고 현재 훨씬 더 정확하다.

[0023] 세레브로리신은 정제된 뇌 단백질로부터 유래되어 단백질분해적으로 생성되는 신경펩티드의 약학 제제이다. 세레브로리신은 시중에서, 종종 표준화된 제품으로서 입수가능하다. 세레브로리신은 15 내지 30%의 저분자량 펩티드(<10 kDa) 및 70 내지 85%의 유리 아미노산, 예를 들어 알라닌, 아스파트산, 아르기닌, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 쓰레오닌, 트립토판, 시스테인 및 발린을 포함한다. 용액은 바람직하게는 멀균성이며 바로 주사되거나 주입된다(즉, 상기는 인간 환자에게 투여되도록 약학 제제에 대한 모든 표준 및 요건을 충족시킨다). 세레브로리신 제제는 EP 0 452 299 A1 CN 및 문헌[Gromova et al., Difficult Patient 8 (2010), 25-31]에 개시되어 있다.

[0024] 본 발명에 따라 사용되기에 바람직한 세레브로리신 농도는 수용액 중에 mL당 50 내지 1000 mg, 바람직하게는 100 내지 500 mg, 특히 150 내지 250 mg의 세레브로리신 농축물을 함유한다. 상기에 이미 서술한 바와 같이, 세레브로리신은 총 질소 함량을 기준으로 대략적으로 85%의 유리 아미노산 및 15%의 저분자량 펩티드(<10 kDa)를 함유한다.

[0025] 세레브로리신 농축물은 표준화된 함량의 특정 아미노산을 갖는다. 상기 농축물에서(그의 농도를 필요에 따라 투여시 변화시킬 수 있다), 세레브로리신은 하기의 아미노산 함량(세레브로리신 농축물 중의 mg/mL)을 갖는다: 알라닌: 2.40 내지 3.60, 특히 3.10 내지 3.50; 아스파트산: 2.40 내지 3.60, 특히 2.20 내지 3.50; 발린: 1.60 내지 2.40, 특히 2.10 내지 2.40 히스티딘: 1.04-1.56, 특히 1.10 내지 1.50; 글리신: 1.20 내지 1.80, 특히 1.60 내지 1.90; 글루탐산: 3.20-4.80, 특히 3.30 내지 4.60; 이소류신: 1.60 내지 2.40, 특히 2.20 내지 2.40; 류신: 4.80 내지 7.20, 특히 5.70 내지 6.30; 리신: 4.80 내지 7.20, 특히 5.80 내지 7.20; 메티오닌: 0.35 내지 0.65, 특히 0.40 내지 0.70; 프롤린: 1.60 내지 2.40, 특히 2.00 내지 2.40; 세린: 0.21 내지 0.39, 특히 0.23 내지 0.36; 쓰레오닌: 0.21 내지 0.39, 특히 0.26 내지 0.35; 트립토판: 0.35 내지 0.65, 특히 0.40 내지 0.70; 페닐알라닌: 1.60 내지 2.40, 특히 1.60 내지 2.40. 상기 농축물의 희석시, mL당 특정 아미노산의 절대량이 감소하지만; 서로 및 저분자량 펩티드(10,000 이하의)에 대한 아미노산의 상대적인 비(상기 상대적인 비는 본 발명에 의해 획득된 치료 효과에 필수적인 요소이다)는 희석시 동일한 채로 있다.

[0026] 세레브로리신의 제조 방법은 EP 0 452 299 A1에 개시되어 있으며 돼지 뇌 단백질 분획의 효소적 가수분해로부터 수득된다. 상기 생성물의 각 mL은 아미노산으로서 3.00 mg의 알라닌, 3.00 mg의 아스파라긴산, 0.06 g의 시스틴, 4.30 mg의 글루탐산, 1.50 mg의 글리신, 1.30 mg의 히스티딘, 2.00 mg의 이소류신, 6.00 mg의 류신, 0.50 mg의 메티오닌, 2.00 mg의 페닐알라닌, 2.00 mg의 프롤린, 0.30 g의 세린, 0.30 g의 쓰레오닌, 0.50 g의 트립토판 및 2.00 mg의 티로신뿐만 아니라 10,000 이하의 분자량을 갖는 펩티드를 함유한다. EP 0 452 299 A1에 개시된 제제 중의 펩티드 및 아미노산의 혼합물은 (전형적인 세레브로리신 생성물에 관하여) 10,000 이하의 분자량을 갖는, 대략 15%의 펩티드 및 대략 85%의 유리 아미노산을 함유하였다.

[0027] 적용되는 용량은 바람직하게는 100 내지 10,000 mg(0.5 내지 50 mL 세레브로리신 농축물)의 범위일 수 있다. 바람직하게, 카다실 환자를 21.5 내지 21,520 mg의 세레브로리신 농축물에 상응하는, 0.1 내지 100 mL, 바람직하게는 1 내지 50 mL 범위의 세레브로리신 용량으로 치료한다(바람직한 세레브로리신 농축물은 215.2 mg/mL을 함유한다). 근육내로 적용되는 경우, 용량은 대개 정맥내보다는 낮다(예를 들어 정맥내로, 바람직하게는 0.5 내지 5 mL 및 바람직하게는 0.5 내지 10 mL). 따라서, 바람직하게는 카다실 환자를 21.5 mg 내지 2152 mg 세레브로리신 농축물에 상응하는, 0.1 내지 10 mL, 바람직하게는 0.5 내지 5 mL의 근육내로 투여되는 용량으로 치료한다. 세레브로리신을 또한 연속적으로 주입할 수 있으며(대개는 10 mL을 초과하는 부피로) 따라서 세레브로리신 농축물을 예를 들어 0.9% 염화 나트륨 용액(9 mg NaCl/mL), 링거액(Na⁺ 153.98 mmol/L, Ca²⁺ 2.74 mmol/L, K⁺ 4.02 mmol/L, Cl⁻ 163.48 mmol/L), 5% 글루코스로 희석할 수 있다. 전형적으로 5분 내지 4h, 바람직하게는 10 분 내지 2h, 특히 15 내지 60분의 주입 기간이, 예를 들어 1 내지 100d, 바람직하게는 5 내지 50d, 바람직하게는 10 내지 30d 동안 수행될 수 있다(바람직하게는 매일)(대개, 투여는 주말이 아닌 평일에만 수행되며, 따라서 대개 치료 주기는 3 내지 5 x 5 연속 투여일로 적용된다). 바람직한 실시태양에 따라, 카다실 환자를 215.2 내지 21,520 mg 세레브로리신 농축물에 상응하는, 0.1 내지 100 mL, 바람직하게는 1 내지 50 mL의 정맥내 투여 용

량으로 치료한다.

[0028] 치료 주기를 1 내지 6, 1 내지 3, 바람직하게는 2 내지 3개월의 무-치료 기간 후에 반복할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 본 발명을 하기의 실시예 및 도면에 의해 추가로 예시하지만, 이들로 제한하지 않는다.

도 1은 염수 처리된 마우스 코호트 대 세레브로리신 그룹의 추산된 사망률을 도시한다(35% 대 0%).

도 2는 중심선 좌우 0.5 mm의 카다실 마우스의 룩솔 패스트 블루 및 니슬 염색된 시상 뇌 절단부를 도시한다. 세포체는 짙은 청색이고; 백질은 청록색을 띤다. 대시선은 관찰된 영역인 전 뇌량을 포함한다.

도 3은 어리고 건강한 마우스(A) 및 18개월된 카다실 마우스(B)의 전 뇌량을 도시한다. 6주된 수컷 C57BL/6의 전 내측 뇌량에서는 액포화가 발생하지 않고(A), 카다실 마우스에서는 현저한 액포화가 발생한다(B). 등근 액포와 대조적으로, 혈관은 신장된 구조로 보인다(내부 프레임을 참조하시오).

도 4는 3 주기의 비히클(좌측) 또는 세레브로리신(우측)으로 12 내지 18개월간 처리된 18개월 된 카다실 트랜스제닉 마우스의 전 뇌량 중 액포의 수를 도시한다. 두 그룹 모두에서, 예상되는 병리, 즉 백질의 액포화가 관찰되었다(두 그룹간에 통계학적 유의수준의 차이는 없다($p=0.12$; 스튜던트 t-검정)).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 실시예:

[0031] 카다실의 쥐 모델에서 세레브로리신의 치료학적 효과

[0032] 물질 및 방법

[0033] 카다실 마우스 모델: NOTCH3^{R169C} 돌연변이(계통 88)

[0034] 카다실에서 세레브로리신의 치료학적 효과를 검사하기 위한 개념 증명 연구를, NOTCH3^{R169C} 돌연변이(계통 88)를 발현하는 확립된 트랜스제닉 카다실 마우스 모델에서 수행하였다. 이러한 특이적인 엑손 4 중 잔기 169에서의 아르기닌에서 시스테인으로의 치환은 카다실 환자에서 기술되었으며 혼한 돌연변이인 것으로 보인다(Joutel et al., 1997). 상기 트랜스제닉 마우스 균주는 앞서 카다실의 다수의 생화학적 태양을 나타내기 위해 상세히 특성화되었으며 따라서 상기 질병에 적합한 유전학적 동물 모델로 간주된다(Ghosh et al., 2015; Joutel et al., 2010). 주텔과 동료(Joutel et al., 2010)는 마우스에서의 돌연변이된 트랜스유전자의 생체내 발현이 내인성 NOTCH3 발현 패턴 및 뇌혈관 중 전형적인 NOTCH3^{ECD} 응집체, GOM 침착물, 진행성 백질 손상 및 감소된 뇌혈류를 포함한 카다실의 주요 병리학적 특징을 재현함을 입증하였다. 돌연변이 마우스는 뇌동맥의 약화된 근원성 반응 및 감소된 구경(calibre)뿐만 아니라 손상된 뇌혈관 자동조절, 기능성 충혈 및 백질 모세혈관 밀도의 실질적인 감소를 나타내었다. NOTCH3^{R169C} 모델의 최근의 특성화는 카다실 병리의 원인인 뇌혈관의 기능장애 및 BBB 누출에서 혈관주위세포의 중요한 역할을 밝혀내었다(Ghosh et al., 2015). 저자는 나이의 증가와 함께, 혈관주위세포 및 평활근 세포 주변에 돌연변이된 NOTCH3가 응집됨을 입증하였다. NOTCH3 축적은 세포사멸을 야기하였고, 이는 혈관주위세포 수 및 혈관주위세포 프로세스에 의한 모세혈관의 커버리지의 현저한 감소를 도출하였다. 이러한 변화는 혈장 단백질의 누출, 내피 부착성 접합 단백질의 발현 감소 및 이산화 탄소에 대한 감소된 미세혈관 반응성에 의해 측정되는 바와 같은, 뇌 미세혈관으로부터의 성장세포 종말단추의 탈착, BBB의 개방 및 미세혈관 기능장애와 관련되었다.

[0035] 실험 수행:

[0036] 상기 카다실 마우스 모델에서의 세레브로리신의 효과를 평가하기 위해서, 28마리의 동물을 사용하여, 3회의 처리 주기의 개시 전에 12개월이 넘게 키웠다. 돌연변이 마우스에게 0.9% 염수 중에서 희석된 2.5 ml/kg의 세레브로리신, 또는 염수만을 투여하였다. 처리는 매주 5회 IP 주사의 3-주 주기(처리당 마우스당 총 3 x 15회의 주사)로 무작위 완전 맹검 방식으로 적용되었다. 동물을 각각 12, 14 및 16개월의 월령에서 처리하였으며 18개월의 월령에서 분석을 위해 희생시켰다. 상기 처리 섭생은 상이한 신경퇴행성 질환에서 치료학적 세레브로리신 효과를 시험하는 실험 연구에서 획득된 데이터를 근거로 선택되었다. 처리 개시에 앞서 12-개월 노화 과정의 이유는 상기 모델의 마우스가 상기 월령 부근에서 카다실의 전형적인 질병 특징을 나타내기 시작한다는 관찰로

부터 나왔다(Joutel et al., 2010).

[0037] 더욱이, 번역 태양을 고려하여, 현실적인 임상 상황을 나타내기 위해 예방적 종재 접근이라기보다는 치료학적 접근법이 선택되었으며, 이때 치료법은 일단 병리가 진단을 허용하는 단계까지 진행되었다면 시작될 것이다. 사망률이, 확고하고 임상적으로 유효한 결과 척도를 나타내는 1차적인 매개변수로서 선택되었다. 또한, 카다실-특이성 백질 병변의 정도를 룩솔 패스트 블루 염색을 사용하여 조직학 분석에 의해 정량분석하였다. 이를 위해서, 동물을 관류하고 뇌를 파라핀에 포매시켰다. 동물당, 전 내측 뇌량 중의 3개의 시상 절단부의 2개의 카운팅 영역을 검사하였다.

[0038] 결과

[0039] 세레브로리신 처리는 카다실 트랜스제닉 마우스의 사망률을 완전히 예방하였다. 12 내지 18개월의 관찰 기간(동물 월령에 상응하게)에 걸쳐, 대조용 그룹에서 14 마리의 마우스 중 5마리(36%)가 죽었으나, 세레브로리신-처리된 동물은 한 마리도 죽지 않았다. 염수 처리된 코호트의 추정 사망률은, 0%인 세레브로리신 그룹에 대해 35%였으며, 이는 세레브로리신 치료법이 상기 질병에서 생존-증대 효과를 발휘하였음을 나타낸다(도 1).

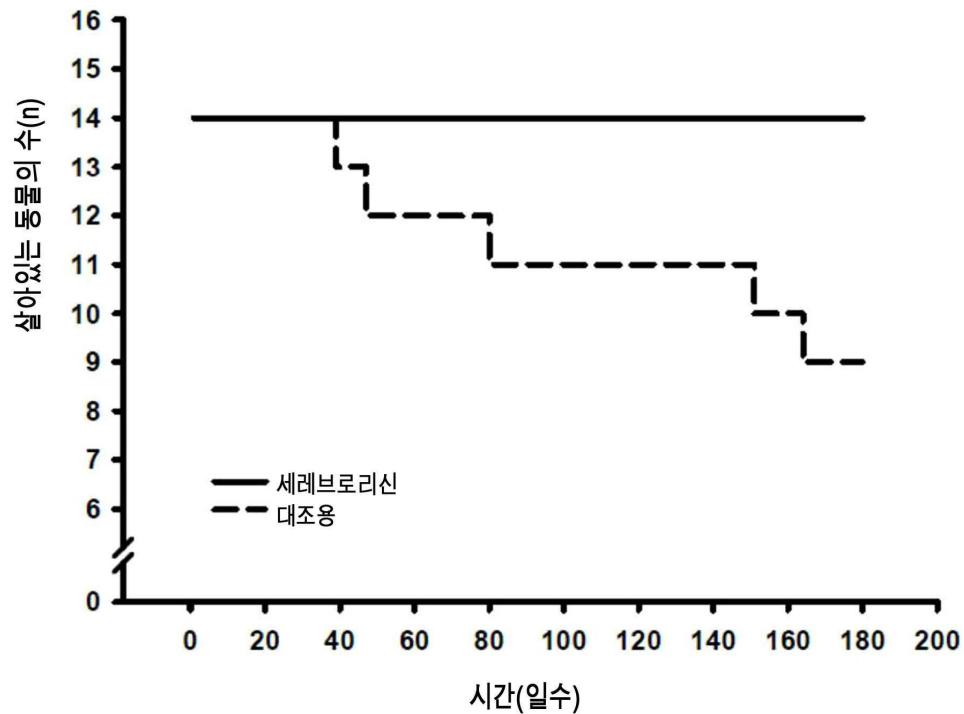
[0040] 이어서 동물을 관류 고정에 의해 죽이고 뇌를 제거하여, 파라핀에 포매시키고, 시상 절단하고 백질 중 액포화의 검사를 위해 룩솔 패스트 블루로 염색하였다. 도 2는 중심선 좌우 0.5 mm의 카다실 마우스의 룩솔 패스트 블루 및 니슬 염색된 시상 뇌 절단부를 도시한다. 세포체는 짙은 청색이고; 백질은 청록색을 띤다. 대시선은 관찰된 영역인 전 뇌량을 포함한다.

[0041] 6주 된 수컷 C57BL/6는 전 내측 뇌량의 액포화를 나타내지 않았으며(도 3A), 상기 구조는 카다실 마우스에서 병리학적으로 변경되었다(Joutel et al., J. Clin. Invest. 120 (2010), 433-445). 대조적으로, 카다실 마우스에서는 현저한 액포화가 관찰되었다(도 3B). 따라서, 문헌으로부터 공지된 카다실 마우스의 백질의 병적인 변화를 재현하는 것이 가능하였다. 담체 물질로 처리된 동물에서, 22 ± 7 개의 액포(평균土표준 편차, n=8)가 측정되었고, 세레브로리신으로 처리된 동물에서는 26 ± 5 개의 액포(n=14)가 측정되었다. 상기 그룹간의 차이는 유의수준이 아니다(도 4; p=0.12; 스튜던트 t-검정). 이에 관하여, 세레브로리신은 카다실 마우스에서 백색 물질의 액포화에 영향을 미치지 않는 것으로 보인다.

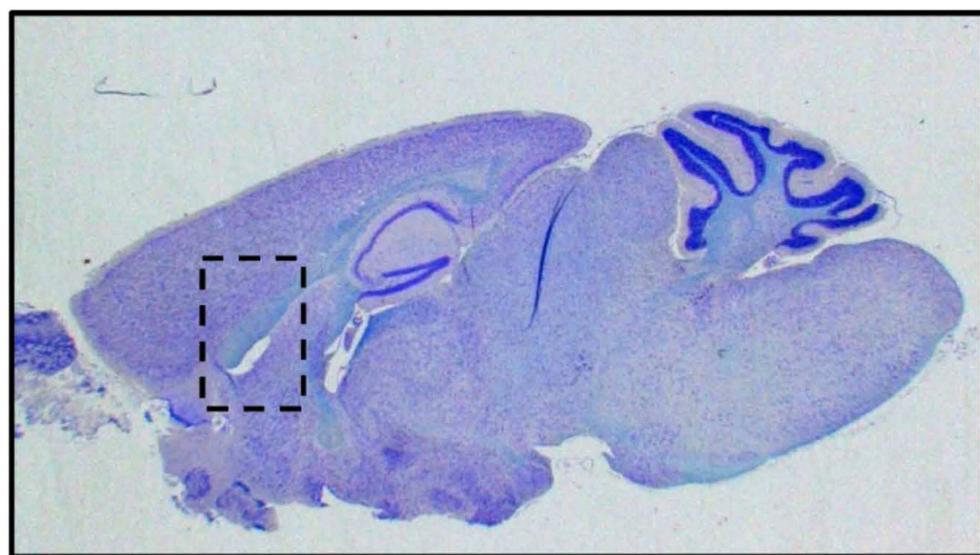
[0042] 종합하면, 사망률에 대한 현저한 긍정적인 효과는 세레브로리신이 카다실 질병에 대항하는 효능 있는 치료제 후보임을 나타낸다.

도면

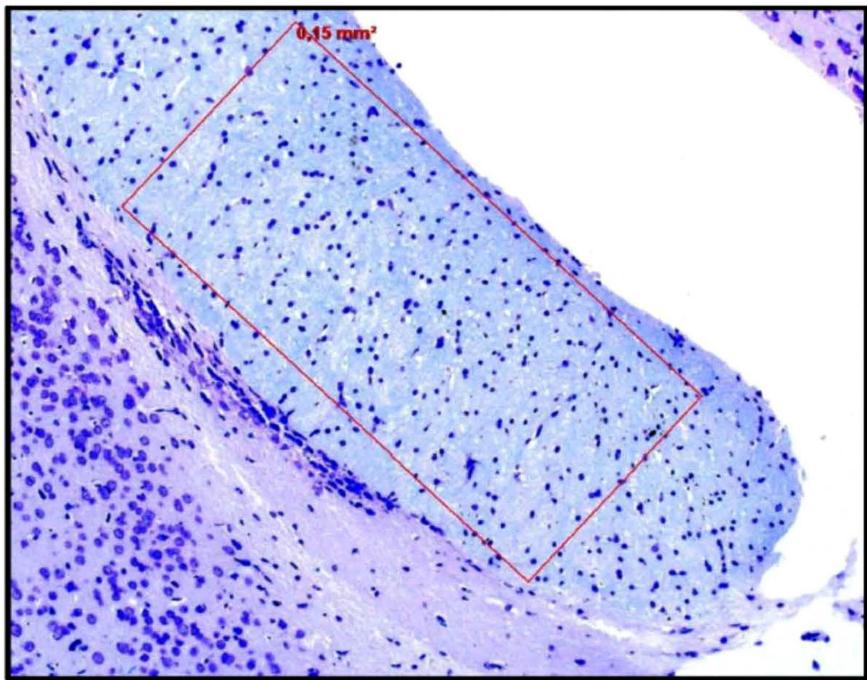
도면1



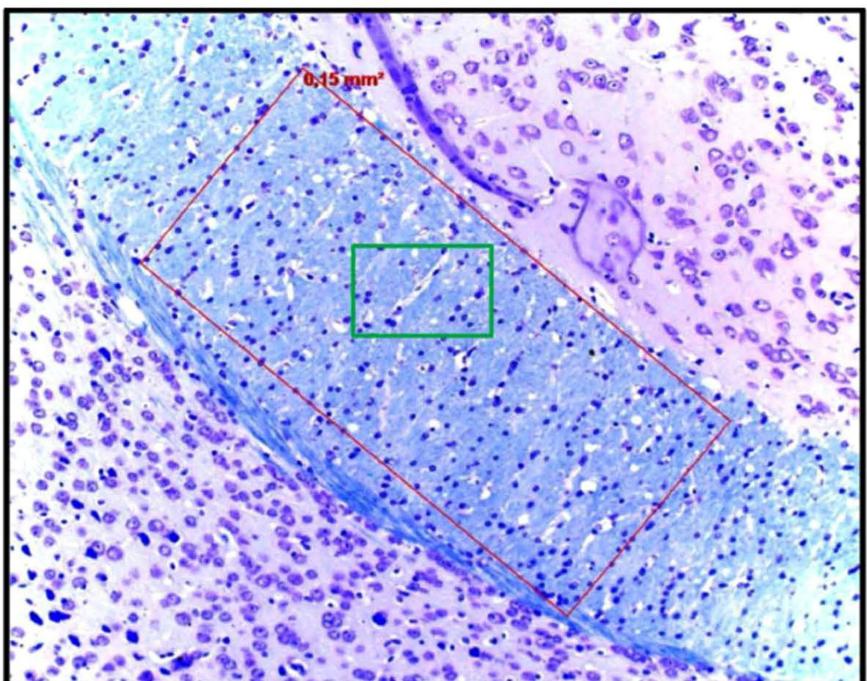
도면2



도면3a



도면3b



도면4

