



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년11월20일

(11) 등록번호 10-2603711

(24) 등록일자 2023년11월14일

- | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 38/18</i> (2006.01) <i>A61K 45/00</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 38/1883</i> (2013.01)
 <i>A61K 45/00</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-7010326</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2015년10월08일
 심사청구일자 2020년10월05일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2017년04월14일</p> <p>(65) 공개번호 10-2017-0066440</p> <p>(43) 공개일자 2017년06월14일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/CN2015/091459</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2016/058493
 국제공개일자 2016년04월21일</p> <p>(30) 우선권주장
 201410550212.7 2014년10월17일 중국(CN)</p> <p>(56) 선행기술조사문헌
 JP2014094951 A*
 KR1020140076570 A*
 WO2014138502 A1*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌</p> | <p>(73) 특허권자
 쟈순(상하이) 사이언스 앤드 테크놀로지 캄파니 리미티드
 중국 상하이 프리 트레이드 트라이얼 존 줄리 로드 넘버 68 빌딩 2, 3층</p> <p>(72) 발명자
 쯔우, 밍둥
 오스트레일리아 뉴 사우스 웨일스 2207 웨스트본 백슬리 1</p> <p>(74) 대리인
 특허법인 광장리앤고</p> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 이예리

(54) 발명의 명칭 **박출물 보존 심부전을 예방, 치료 또는 지연시키기 위한 뉴레글린 조성물 및 방법**

(57) 요약

본원에는 포유동물의 박출물 보존 심부전을 예방, 치료 또는 지연시키기 위한 약물의 제조에서 뉴레글린 단백질의 용도, 및 상기 약물 사용 방법이 개시되어 있다. 또한, 본 발명에는 박출물 보존 심부전을 앓고 있거나 앓을 위험이 있는 특수 집단에서 뉴레글린 단백질을 함유한 약물의 사용을 포함하는, 포유동물의 박출물 보존 심부전을 예방, 치료 또는 지연시키기 위한 방법이 제공된다.

명세서

청구범위

청구항 1

유효량의 뉴레굴린(NRG)을 포함하는, 인간 환자의 박출률 보존 심부전을 예방, 치료 또는 지연시키기 위한 약제학적 제제로서,

뉴레굴린은 서열 1(SEQ ID NO: 1)의 아미노산 서열을 가지는 NRG-1인, 약제학적 제제.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항의 약제학적 제제 및 박출률 보존 심부전을 치료하기 위한 기타 약물을 포함하는, 포유동물의 박출률 보존 심부전을 예방, 치료 또는 지연시키기 위한 조성물로서,

박출률 보존 심부전을 치료하기 위한 기타 약물은 안지오텐신 전환효소 억제제/안지오텐신 II 수용체 억제제, 베타 수용체 길항제, 칼슘 길항제, 시클릭 아데노신 모노포스페이트, 카테콜아민, 질산염 포스파타제 억제제(nitrate phosphatase inhibitor), 이노제, 레닌 안지오텐신 알도스테론 시스템(renin angiotensin aldosterone system, RAS) 길항제 및 심근 에너지 최적화제로 구성된 군으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 6

제1항의 약제학적 제제의 1회 이상의 투여량 및 상기 약제학적 제제를 사용하는 방법에 대한 설명서를 포함하는, 포유동물의 박출률 보존 심부전을 예방, 치료 또는 지연시키기 위해 사용되는 키트(kit).

청구항 7

제5항에 있어서,

박출률 보존 심부전을 치료하기 위한 기타 약물은 캅토프릴을 포함하는 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

약제학적 제제의 1회 이상의 투여량 각각은 재조합 인간 뉴레굴린 0.3 μ g/kg/일의 양을 포함하는 키트.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 포유동물에서 박출률 보존 심부전(heart failure with preserved ejection fraction)을 예방, 치료 또는 지연시키는 약제 제조에 있어서의 뉴레굴린(Neuregulin) 단백질의 용도와 포유동물에서 박출률 보존 심부전을 예방, 치료 또는 지연시키기 위해 상기 약제를 이용하는 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 박출률 보존 심부전을 앓고 있거나 앓을 위험이 있는 특수 집단에게 뉴레굴린 단백질을 포함하는 약제를 투여하는 것을 포함하는, 포유동물의 박출률 보존 심부전을 예방, 치료 또는 지연시키는 방법을 제공한다. 특히 본 발명은, 심혈관계 질환, 즉 박출률 보존 심부전의 치료에 있어서의 뉴레굴린의 새로운 적응증에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 아교 성장 인자(glial growth factor, 이하에서, "GGF"로 지칭됨) 및 신분화인자(new differentiation factor, 이하에서, "NDF"로 지칭됨)로도 알려진 뉴레굴린(이하에서, "NRG"로 지칭됨; 또는 히레굴린(HRG))은 44KD의 분자량을 갖는 당단백질의 일종이다. 뉴레굴린은 ErbB 패밀리의 티로신 키나제 수용체의 리간드로서, 세포 신호(cell signaling)에 관여한다. NRG 패밀리는 4개 구성원을 포함한다: NRG1, NRG2, NRG3 및 NRG4(Falls et al., Exp Cell Res. 284:14-30, 2003). NRG1은 신경계, 심장 및 유방에서 중요한 역할을 한다. NRG1 신호 전달은 기타 기관계의 발달 및 기능과, 인간질환(조현병 및 유방암 포함)의 발병에서도 중요한 역할을 하는 것으로 증명되었다. NRG1은 다수의 이소형(isomer)을 갖는다. 유전자 돌연변이된 마우스(유전자 녹아웃(knock-out) 마우스)를 이용한 연구 결과는 상이한 N 말단 영역 또는 EGF-유사 도메인(domain)을 갖는 이소형들은 상이한 생체내(in vivo) 기능을 갖는 것을 시사한다. 본 발명은 NRG-1 β 에 기초하고 있다.

[0003] NRG-1 β 는 막관통(transmembrane) 단백질에 해당한다(Holmes et al., Science 256, 1205-1210, 1992). 세포의 영역(extracellular region)은 면역글로불린 유사 도메인(Ig-like domain)과 EGF 유사 도메인을 포함하는 N 말단 영역이다. 세포내 영역은 C 말단 영역이다. 세포의 기질 금속단백분해효소(matrix metalloproteinase)의 작용으로, NRG의 세포외 영역은 효소에 의해 절단된 후 자유로운 상태로 있음으로 인해, 주변 세포 표면 상에서 Erb3 수용체와의 결합을 용이하게 하고 관련 세포 신호 전달을 활성화시킨다.

[0004] EGF 수용체 패밀리는 약 180-185KD의 분자량을 갖는 막관통 단백질인 ErbB1, ErbB2, ErbB3 및 ErbB4를 포함한 4개 종류로 분류될 수 있다. ErbB2를 제외하고, 이들은 모두 N 말단 영역에서 세포의 리간드 결합 도메인을 포함한다. ErbB3을 제외하고, 이들은 모두 세포내 C 말단 영역에서의 단백질 티로신 키나제 활성을 포함한다. 그 중 ErbB1은 표피 성장 인자 수용체인 반면, ErbB3 및 ErbB4는 뉴레굴린 수용체이다. 이들 뉴레굴린 수용체 중에서, 단지 ErbB2 및 ErbB4만이 심장에서 높게 발현된다. (Yarden et al., Nat Rev Mol Cell Biol, 2: 127-137, 2001)

[0005] NRG는 ErbB3 또는 ErbB4의 세포외 도메인에 결합한 이후에, ErbB3, ErbB4와 다른 ErbB 수용체(통상적으로 ErbB2를 포함하는)의 헤테로이량체, 또는 ErbB4의 호모이량체의 형성을 야기하며, 이는 수용체의 세포내 영역의 인산화반응을 초래한다(Yarden et al., Nat Rev Mol Cell Biol, 2: 127-137, 2001). 이후 인산화된 세포내 도메인은 추가로 세포 내 여러 가지 시그널링 단백질과 결합하여, 하류(downstream) AKT 또는 ERK 신호전달 경로를 활성화하고, 세포 증식, 세포 사멸(apoptosis), 세포 이동, 세포 분화, 또는 세포 부착의 자극 또는 억제와 같은 일련의 세포 반응을 유도한다.

[0006] NRG는 심장의 발달에 있어 특히 중요한 역할을 한다(W00037095호, CN1276381호, W003099300호, W09426298호, US6444642호, W09918976호, W00064400호, Zhao et al., J.Biol.Chem. 273, 10261-10269, 1998). 배아 발달의 초기 단계에서, NRG의 발현은 심내막 내부에 국한되어 있다가, 이후 측분비(paracrine)에 의해 말초 심근 세포로 방출되고 세포막 상의 단백질 티로신 키나제 수용체 ErbB4의 세포외 도메인에 결합하고, ErbB4는 ErbB2와 헤테로이량체를 형성한다. ErbB4/ErbB2 복합체의 형성 및 활성화는 초기 단계에서 해면 모양의 심장이 섬유주(trabecular)를 형성하는데 필수적이다. NRG 단백질, ErbB4 및 ErbB2에 대한 세 단백질 유전자 중 어느 하나라도 결핍하게 되면 배아는 섬유주가 없게 되며 발달 초기 단계에서 자궁에서 사망하게 된다. W00037095호는 일정한 농도의 뉴레굴린이 ERK 신호전달 경로를 지속적으로 활성화하고, 심근 세포의 분화 및 성장을 촉진시키며, 심근 세포들이 세포들에 부착된 부위에서의 근섬유분절 및 세포골격의 재구성을 가이드하고, 심근 세포들의 구조를 개선하며 심근 세포 수축을 향상시킴을 나타낸다. 또한, W00037095호 및 W0003099300호는 NRG가 여러 심혈관질환의 검출, 진단, 및 치료에 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0007] 다음은 본 발명과 관련된 일부 선행기술 문헌을 나열한 것이다: 1. Cardiac muscle function and manipulation:W00037095; 2. New application of neuregulin and its analogs :CN1276381; 3. Neuregulin

based methods and composition for treating cardiovascular diseases: W003099300; 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: W09426298; 6. Methods of increasing myotube formation or survival or muscle cell mitogenesis, differentiation or survival using a neuregulin: US6444642. 7. Therapeutic methods comprising use of a neuregulin: W09918976; 8. Methods for treating congestive heart failure: W00064400; 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 signaling strategies. 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).

[0008] 심부전(HF)은 수축성 심부전(SHF) 및 이완성 심부전(DHF)을 포함한 다양한 심장 질환에 의해 발생하는 심부전 증후군이다. 2008년에, 유럽 심장학회(ESC)는 *Diagnosis and treatment guidelines of acute/chronic heart failure*를 발행하였으며, DHF를 박출물 보존 심부전(HF-PEF)으로서 정의하였다. 수축성 심부전이 있게 되면 심장의 심근 수축성이 감소되어 심박출량이 신진대사의 필요성을 충족시키지 못하거나 조직 또는 기관 관류저하, 폐순환 및/또는 체순환 윤휴이 야기된다. 박출물 보존 심부전(HF-PEF)은 보통 좌심실의 심장 확장기 이완 장애 및 심근 순응도(myocardial compliance) 감소로 인한 이완성 심부전을 의미하며, 심근 세포 비대증 및 좌심실 강직의 간질섬유증이 증가해 심장 이완기 충전 장애, 감소된 박출량, 증가된 좌심실이완기말압 및 심부전 발생을 일으킨다. 2006년의 미국심폐기관(American Heart and Lung Institute)으로부터의 역학 자료는 박출물 보존 심부전 또는 이완성 심부전이 총 심부전 환자수의 50%를 초과하였음을 보여주었다. 박출물 보존 심부전은 단독으로 존재할 수 있으며, 또한 심장 수축성 기능장애와 함께 나타날 수 있다. 박출물 보존 심부전은 고혈압, 당뇨병 및 좌심실비대를 가진 노인 여성에서 보다 일반적이다.

[0009] 이완성 심부전 및 수축성 심부전은 유사한 증상 및 징후를 갖는다. 환자들은 대개 혈압이 높고 기타 기초 질환들을 갖고 있다. 심부전의 초기 단계에서는, 설명할 수 없는 피로, 감소된 운동 내구력, 분당 15 내지 20회 증가된 심박수가 좌심실 기능 저하의 초기 징후가 될 수 있다. 이후에, 운동성 호흡곤란 및 발작성 야간 호흡곤란, 베개를 높인 수면의 증상이 있을 수 있다. 환자의 운동 내구력 장애가 점차적으로 발생하는 동안, 복부 또는 다리 부종이 주요 증상 또는 단일 증상으로서 환자에게 발생할 수 있다.

[0010] 이완기는 수축기보다 복합적인 요인들을 포함하는 보다 복잡한 생리적 과정이다. 따라서, 박출물 보존 심부전 또는 이완성 심부전의 진단은 수축성 심부전보다 더욱 어렵다. 하기 조건들이 충족되는 경우, 진단이 이루어질 수 있다:

- [0011] 1. 심부전의 전형적인 증상 및 징후;
- [0012] 2. 정상 LVEF (또는 경미한 감소 $\geq 45\%$), 정상 좌심실 형태;
- [0013] 3. 기저 심장 질환의 증거가 있는 경우로서, 예를 들어 고혈압 환자가 심장 초음파에서 좌심실비대, 좌심방비대 및 좌심실 이완성 기능장애를 가짐;
- [0014] 4. 증가된 BNP/NT-ProBNP;
- [0015] 5. 심장 초음파 상에서 심장판막증이 나타나지 않으며, 심장막 질환, 비대성 심근병증, 제한(침윤)심근병증 등은 배제되었음.

[0016] 박출물 보존 심부전 또는 이완성 심부전은 병인이 좌심실 압력/체적 메커니즘인 것으로 더 알려진 다양한 원인과 관련되어 있다. 고혈압, 비대성 심근병증, 대동맥판막 협착증이 있는 환자는 현저하게 증가된 심실이완기말압 및 현저하게 감소된 좌심실 용량을 가지며, 이는 심실 충전(ventricular filling)에 영향을 미쳐 압력 및 용량 곡선 좌방이동(left shift) 및 구심성 리모델링(centripetal remodeling)의 형성으로 이어진다. 장기적인 스트레스 과부하는 이완성 심부전의 발생을 야기한다.

[0017] 심실 이완기 기능은 심실 근육의 이완(자주적 에너지 소모(initiative energy consumption) 과정) 및 순응의 두 단계를 포함한다. 심실 근육의 이완은 이완기 동안의 단위 시간당 심장 공동 압력(heart cavity pressure)의 변화로서, 자주적 에너지 소모 과정이다. 심실 근육의 순응은 이완기 동안의 단위 체적의 변화에 의해 야기되는 심장 공동 압력의 변화로서, 수동적 충전 과정이다. 이완은 초기 이완기에서의 심실 근육의 자주적 이완기로서, 수축전기(收縮前期)의 길이와 압력으로 회복하는 심근섬유의 능력이며, 등용성 이완(isovolumic relaxation) 및

초기 이완기 급속 충전 단계를 포함하는 에너지 의존성 Ca^{2+} 수송 자주적 에너지 소모 과정이다. 좌심실 이완은 등용성 이완(IVRT) 기간, 최대 압력 강하율($-dp/dt$), 승모판막 E 피크 감속 시간(DT) 등을 포함하는 변수들에 의해 반영된다. 2차원 심장 초음파 검사 및 혈류 역학(hemodynamic) 검사에 의해 수득된 이러한 변수들은 심장의 이완기 기능을 어느 정도로 평가하기 위해 사용될 수 있다.

[0018] 또한, 박출률 보존 심부전을 위한 특정한 치료가 존재하지 않는다. 현재의 치료 지침은 혈압 조절, 심박률(ventricular rate) 감소, 체액저류(fluid retention) 감소를 위한 표준 치료 약물로서, 수축성 심부전 증상을 개선할 수 있으나, 박출률 보존 심부전의 임상 증상 및 예후를 개선할 수는 없는 표준 치료 약물(안지오텐신-전환효소 억제제(angiotensin-converting enzyme inhibitor)/안지오텐신 II 수용체 억제제, β -차단제 및 이뇨제와 같은)의 사용을 포함한다. 최종적으로, 박출률 보존 심부전 또는 이완성 심부전을 가진 환자들은 예후가 좋지 않고, 재입원률이 높으며, 입원이 반복되므로, 전체 의료계의 부담이 증가한다. 수축성 심부전은 이완성 심부전 발달의 결과이다. 이완성 심부전의 초기 단계에서 심장 이완기 성능을 어떻게 개선하고, 추가적인 저하를 어떻게 예방할지는 이완성 심부전의 치료에 있어서 큰 도전으로 남아 있다.

[0019] 선행기술 문헌에서 박출률 보존 심부전 또는 이완성 심부전과 관련된 뉴레귤린 단백질의 역할에 대한 보고는 존재하지 않는다. 본 발명은 포유동물에 대한 뉴레귤린의 투여가 박출률 보존 심부전의 증상을 현저하게 개선할 수 있으며, 뉴레귤린이 포유동물의 박출률 보존 심부전을 예방, 치료 또는 지연시키기 위한 약물의 제조에 사용될 수 있다는 점을 발견하였다.

발명의 내용

[0020] A. 발명의 요약

[0021] 본 발명은 NRG가 심장 발달과 성인 심장의 기능의 유지에 중요하다는 과학적 발견에 기초하고 있다. 본 발명은 NRG가 심근세포 근절, 세포골격 및 세포간 연결(intercellular junction)의 형성을 강화할 수 있다는 과학적 발견에 기초하고 있다. 본 발명은 또한 동물 모델 및 임상시험에서 NRG가 심부전에 걸린 동물 및 환자들의 심장 기능을 개선시킬 수 있다는 과학적 발견에 기초하고 있다. 뉴레귤린, 뉴레귤린 폴리펩티드, 뉴레귤린 유도체, 또는 뉴레귤린의 활성을 모방하는 화합물들은 모두 본 발명의 범위에 포함된다.

[0022] NRG 단백질은 심근세포 표면에서 ErbB 수용체에 결합하고, 세포 내의 ERK 신호전달 경로를 연속적으로 활성화하여, 심근 세포의 구조를 바꿈으로써, 심근 세포의 기능을 개선한다.

[0023] 본 발명의 첫 번째 양태에서, 박출률 보존 심부전의 예방, 치료 및 지연의 효과를 달성하기 위하여, 박출률 보존 심부전의 예방, 치료 및 지연시키는 것이 필요한 또는 이를 회피하는 포유동물, 특히 인간에 대하여 NRG 또는 그의 기능적 단편, 또는 NRG 또는 그의 기능적 단편을 코딩하는 핵산, 또는 NRG의 생산량 및/또는 그의 기능을 개선시키는 물질의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 포유동물, 특히 인간에서의 박출률 보존 심부전의 예방, 치료 및 지연을 위한 방법이 제공된다.

[0024] 두 번째 양태에서, 본 발명은 유효량의 NRG 또는 그의 기능적 단편, 또는 NRG 또는 그의 기능적 단편을 코딩하는 핵산, 또는 NRG의 생산량 및/또는 기능을 개선하는 물질, 및 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제(excipient), 등을 포함하는, 포유동물, 특히 인간에서의 박출률 보존 심부전의 예방, 치료 및 지연을 위한 약제학적 제제(pharmaceutical preparation)를 제공한다. 상기 약제학적 제제는 박출률 보존 심부전을 예방, 치료 및 지연시키기 위한 기타 약물과 조합되어 사용될 수 있다.

[0025] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 의해 제공된 포유동물에서의 박출률 보존 심부전의 예방, 치료 및 지연을 위한 약제학적 제제, 및 박출률 보존 심부전의 예방, 치료 및 지연을 위한 기타 약물(들)을 포함하는, 포유동물, 특히 인간에서의 박출률 보존 심부전의 예방, 치료 및 지연을 위한 조성물을 제공한다.

[0026] 본 발명은 이에 더하여 박출률 보존 심부전의 예방, 치료 및 지연을 위한 상기 약제학적 제제 또는 조성물의 하나 이상의 투여량, 및 상기 약제학적 제제 또는 조성물을 사용하는 방법에 대한 설명서를 포함하는, 포유동물, 특히 인간에서의 박출률 보존 심부전의 예방, 치료 및 지연을 위한 키트(kit)를 제공한다.

[0027] B. 정의

[0028] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 언급된 모든 특허, 출원, 공개된 출원 및 기타 출판물들은 전체가 참고로 인용된다. 본 항목에서 나타난 정의가 본원에 참고로 인용된 특허,

출원, 공개된 출원 및 기타 출판물들에 나타난 정의와 상반되거나 부합하지 않는 경우, 본 항목에서 나타난 정의가 본원에 참고로 인용된 정의보다 우선된다.

- [0029] 본원에서 사용된 단수형은 달리 명백히 나타내지 않는 한 "적어도 하나" 또는 "하나 이상"을 의미한다.
- [0030] 본원에서 사용된 "뉴레귤린" 또는 "NRG"는, ErbB2, ErbB3, ErbB4 또는 그의 헤테로이량체 또는 호모이량체와 결합하고 활성화시킬 수 있는 단백질 또는 폴리펩티드로서, 뉴레귤린 이성질체, 뉴레귤린 EGF-유사 도메인, 뉴레귤린 EGF-유사 도메인을 포함하는 폴리펩티드, 뉴레귤린 돌연변이체 또는 유도체, 및 상기 수용체들을 활성화시킬 수 있는 임의 종류의 뉴레귤린-유사 유전자 산물을 포함한다. 뉴레귤린은 또한 NRG-1, NRG-2, NRG-3 및 NRG-4 단백질, 펩티드, 단편, 및 뉴레귤린의 기능을 갖는 화합물을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 뉴레귤린은 ErbB2/ErbB4 또는 ErbB2/ErbB3 헤테로이량체에 결합하며 이들을 활성화시킬 수 있는 단백질 또는 폴리펩티드이며, 예를 들면(이에 한정되는 것은 아님), 본 발명의 NRG는 NRG-1 β 2 이성질체의 단편, 즉, 다음 아미노산 서열: SHLVKCAEKEKTFVNGGECFMVKDLNPSRYLCKCPNEFTGDRQCQNYVMASFYKAEELYQ (서열(SEQ ID NO): 1)을 갖는 EGF-유사 도메인을 함유하는 177-237 아미노산 단편을 포함한다. 본 발명의 NRG 단백질은 상기 수용체들을 활성화시킬 수 있으며, 그의 생물학적 작용을 조절, 예를 들면, 골격근 세포에서 아세틸콜린 수용체의 합성을 자극하고, 심근 세포의 분화와 생존 및 DNA 합성을 증진시킬 수 있다. 상기 NRG 단백질은 또한 생물학적 작용에 실질적으로 영향을 주지 않는 보존적 돌연변이를 보유하는 NRG 돌연변이체들을 포함한다. 중요하지 않은 영역에서 단일 아미노산의 돌연변이는 일반적으로 생성된 단백질 또는 폴리펩티드의 생물학적 기능을 변경시키지 않는 것이 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있다(예를 들어, Watson et al., Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, The Bejacmin/Cummings Pub.co., p.224 참조). 본 발명의 NRG 단백질은 천연 공급원으로부터 분리되거나, 재조합 기술, 인공 합성 또는 다른 방법에 의해 얻을 수 있다.
- [0031] 본원에서 사용된 "상피 성장 인자-유사 도메인" 또는 "EGF-유사 도메인"은, ErbB2, ErbB3, ErbB4 또는 그의 헤테로이량체 또는 호모이량체에 결합하고 이를 활성화시키며, 그 내용이 모두 본원에 참고로 인용된 하기 문헌들에 개시된 바와 같은 EGF 수용체 결합 영역과 구조적으로 유사한 뉴레귤린 유전자에 의해 코딩된 폴리펩티드 단편을 말한다: 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. 특정 실시양태에서, EGF-유사 도메인은 ErbB2/ErbB4 또는 ErbB2/ErbB3 헤테로이량체에 결합하고 이를 활성화시킨다. 특정 실시양태에서, EGF-유사 도메인은 NRG-1의 수용체 결합 도메인의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, EGF-유사 도메인은 NRG-1의 아미노산 잔기 177-226, 177-237 또는 177-240을 말한다. 특정 실시양태에서, EGF-유사 도메인은 NRG-2의 수용체 결합 도메인의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, EGF-유사 도메인은 NRG-3의 수용체 결합 도메인의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, EGF-유사 도메인은 NRG-4의 수용체 결합 도메인의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, EGF-유사 도메인은, 미국 특허 제5,834,229호에 기술된 바와 같이, Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0032] 본원에서 사용되고, 또한 정상 좌심실 박출률 심부전(HFNEF), 좌심실 박출률 보존 심부전(HF-PLVEF), 수축 기능 보존 심부전(HF-PSF), 이완성 심부전(DHF)으로 알려진 "박출률 보존 심부전(HF-PEF)"은 주로 좌심실 확장기 이완 장애 및 감소된 심근 순응도로 인한 정상 또는 약간 감소된 좌심실 박출률(LVEF)을 의미하며, 심근 세포 비대증 및 간질섬유증에 의해 야기된 강직 증가가 심장 이완기 충전 장애, 감소된 박출량, 증가된 좌심실이완기말압 및 심부전 발생을 일으킨다. 이는 홀로 존재하거나, 수축성 기능장애와 동시에 나타날 수 있다.
- [0033] 본원에서 사용된 "등용성 이완기(isovolumic relaxation period, IVRT)"는 심실이 압력 강하의 등용성 폐쇄 상태(isovolumic closed state)에 있는 경우, 대동맥판 및 방실판막이 폐쇄 상태에 있는 반면, 상기 심실이 이완되기 시작하는 것을 의미한다. 좌심실 이완이 손상되는 경우, IVRT가 연장된다. 좌심실 이완이 개선되는 경우, IVRT가 감소한다.
- [0034] 본원에서 사용된 "압력 강하율(-dp/dt)"은 등용성 이완기 동안의 좌심실 압력 강하의 속도를 의미한다. 좌심실 압력 강하의 값이 높고, 속도가 빠를수록, 이완기 기능이 보다 우수하다. 이는 심근 완화를 평가하기 위한 신빙성 있는 지표들 중 하나이다.
- [0035] 본원에서 사용된 "승모판막 E 피크"는 좌심실 급속 충전기에서 판막 오리피스(orifice)를 통과하는 최대 혈류 속도를 반영하는 심장 승모판막 오리피스의 초기 이완기 피크(E)를 의미한다. 상기 승모판막 오리피스 혈류 곡선의 E 피크는 좌심실의 초기 이완기 능동 이완을 반영하며, 좌심실 이완을 반영한다.

[0036] 본원에서 사용된 "E 피크 강하 시간(DT)"은 승모판막 E 피크 강하의 감속 시간을 의미하며, 다시 말해 좌심방으로의 초기 이완기 승모판막 이동에 의해 야기된 혈류 감속은 급속 충전기의 좌심방의 압력 변화를 반영한다. 상기 값이 작을수록, 압력이 보다 빠르게 변화한다. 능동 이완의 감소는 대개 질환의 초기 단계에 발생하며, 이는 좌심실의 초기 이완기 충전 부피의 감소, E 피크의 감소 및 DT의 >240 ms 만큼의 연장으로 나타난다.

[0037] 본원에서 사용된 "박출률 보존 심부전 치료용 기타 약물(들)"은 안지오텐신 전환효소 억제제/안지오텐신 II 수용체 억제제, 베타 수용체 길항제, 칼슘 길항제, 시클릭 아데노신 모노포스페이트, 카테콜아민, 질산염 포스파타제 억제제(nitrates phosphatase inhibitor), 이노제, 레닌 안지오텐신 알도스테론 시스템(renin angiotensin aldosterone system, RAS) 길항제, 심근 에너지 최적화제 등을 포함하는 박출률 보존 심부전의 치료를 위한 약물들을 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 실시예

[0039] 실시예 1: 고혈압성 심부전 래트의 심장 기능에 대한 재조합 인간 뉴레굴린의 효과 연구

[0040] 연구는 심부전이 있는 SHR 고혈압 래트에서의 재조합 인간 뉴레굴린(rhNRG)의 치료 효과에 대한 것이다. 방법: SHR 고혈압 래트 계통, 정상적인 먹이 공급, 먹이 공급 과정에서 심장 기능의 변화를 관찰. 16개월 이후에, 박출률(EF)은 70%까지 감소하였으며, 고혈압 래트 심부전 모델이 성공적으로 수립되었음을 제시. 고혈압성 심부전 래트들을 음성 대조군(negative control group), NRG 치료군 및 캡토프릴(captopril) 처리군으로 무작위적으로 분류하였다. 치료 주기 중 rhNRG를 5일 동안 연속적으로 투여하고, 2일 동안 중단하였으며, NRG 군은 3회의 치료 주기를 받았다. 2회차 및 3회차 치료 주기의 말미에, 심장 기능 변화를 판별하기 위해 각 그룹의 래트들을 심장 초음파 검사하였다. 3회차 치료 주기 이후에, 래트들의 혈류 역학을 측정하였다.

[0041] 1. 실험 동물

[0042] 1.1 계통, 출처: SHR 고혈압 래트 계통은 중국과학원의 동물 센터에서 구입하였다. SHR의 대조군으로서, WKY 계통 또한 중국과학원의 동물 센터에서 구입하였다.

[0043] 1.2 성별, 주수: 수컷, 6주령.

[0044] 1.3 먹이 공급: 일반 설치류 사료, 식수 허용, 12시간 명-암 주기

[0045] 2. 시험약

[0046] 사양: NeucardinTM, 61 아미노산 잔기, Shanghai Zensun Sci & Tech Co., Ltd 제조.

[0047] 3. 시험 재료

[0048] 3.1 심장 초음파 진단기: 필립스 소노스(Philips Sonos) 5500

[0049] 3.2 캡토프릴: Sino American Shanghai Squibb Pharmaceutical Ltd.

[0050] 4. 실험 방법

[0051] 4.1 고혈압성 심부전 래트 모델의 수립

[0052] SHR 고혈압 래트, 정상 먹이 공급, 및 먹이 공급 과정에서의 심장 기능 변화 관찰. 16개월 이후에, SHR 래트의 박출률(EF)은 70%까지 감소하였고, LVDd 및 LVDs가 현저하게 증가하였으며, 고혈압성 심부전 래트 모델이 성공적으로 수립되었음을 제시.

[0053] 4.2 그룹화 및 투여

[0054] 상기 모델이 성공적으로 수립된 이후, 래트들을 음성 대조군, NRG 치료군 및 캡토프릴 처리군으로 무작위적으로 분류하였다. RhNRG를 5일 연속 투여 및 2일 약물 중단의 치료 주기로, 1일 1회 6.5 µg/kg의 양으로 정맥주사 투여하였다. 총 3회 치료 주기를 수행하였다. 동시에, NRG 군은 1일 2회 위내 투여(intragastric administration)에 의해 식수를 주었다. 캡토프릴은 1일 2회, 연속 투여로 위내 투여에 의해 10 mg/kg을 투여하였다. NRG 부형제는 3회 치료 주기 동안 꼬리 정맥주사(tail vein injection)에 의해 투여하였다. 음성 대조군에게는 위내 투여에 의해 식수를 주었고, NRG 부형제를 꼬리 정맥주사에 의해 투여하였다.

- [0055] 4.3 심장 초음파 검사
- [0056] 치료 전과 2회차 및 3회차 치료 주기의 말미에, 심장 기능 변화를 판별하기 위해 케타민 마취 이후 심장 초음파 검사하였다.
- [0057] 4.4 혈류 역학 측정
- [0058] 3회차 치료 주기의 말미에, 3% 펜토바르비탈(pentobarbital) 복강내 주사에 의해 래트들을 마취하였다. 정중절 개술이 목에서 이루어졌고, 좌온목동맥을 분리 및 삽관하였으며, 동맥 및 좌심실 혈류 역학 변수들을 측정하였다.
- [0059] 5. 실험 결과
- [0060] 음성 대조군에 비해, NRG는 고혈압 래트들의 혈류 역학을 현저하게 개선시킬 수 있으며, 이들 중에서 $-dp/dt$ 는 통계적 차이를 나타낸다(각각 -7467.6 ± 715.8 및 -5488.1 ± 1340.3 , $P = 0.016$); 캅토프릴은 고혈압 래트들의 혈압을 현저하게 감소시킬 수 있었다(174.5 ± 33.0 대 216.5 ± 23.2 와 228.0 ± 26.0 ; $p=0.029$, $p=0.017$).
- [0061] 6. 결론
- [0062] $6.5 \mu\text{g/kg}$ 투여량의 rhNRG를 5일 동안의 연속 투여 및 2일의 중단의 투여 주기로 고혈압성 심부전 래트에게 투여하였다. 2주기 또는 3주기의 치료 이후, rhNRG는 좌심실이완기말압 및 수축 종기 용량 비대를 더 예방할 수 있었으며, 고혈압성 심부전 래트들의 심장 기능을 개선하도록 혈류 역학을 개선할 수 있었다. 표 1에서 보이는 바와 같이, 캅토프릴은 혈압을 낮춤으로써 고혈압성 심부전 래트들의 심장 기능을 개선할 수 있는 반면에, rhNRG는 혈압을 낮추지 않고, 등용성 이완기에 좌심실의 강하율 $-dp/dt$ 를 증가시킴으로써, 고혈압성 심부전 래트들의 심장 기능을 개선할 수 있다.

표 1

- [0063] 3회 치료 주기 이후의 각 군의 혈류 역학 변수들

그룹	MAP	$-dp/dt$
음성 대조군	174.7 ± 16.8	-5488.1 ± 1340.3
NRG	182.5 ± 18.8	-7467.6 ± 715.8
캅토프릴	139.9 ± 24.8	-5441.2 ± 1007.3

- [0064] **실시예 2: 박출률 보존 심부전 환자의 심장 기능에 대한 재조합 인간 뉴레굴린의 효과 연구**

- [0065] 박출률 보존 심부전 환자의 심장 기능에 대한 재조합 인간 뉴레굴린의 효과를 평가하기 위해, 위약(placebo)군의 2명의 환자 및 실험군의 2명의 환자를 포함하는 예비적 임상 시험을 상하이 자오통 대학 소속 제 6 인민 병원에서 수행하였다.

- [0066] 1. 주요 포함 기준:

- [0067] 1.1 좌심실 박출률(LVEF) $\geq 50\%$ (2차원 심장 초음파 진단);

- [0068] 1.2 뉴욕 심장 기능(NYHA) II 또는 III 등급;

- [0069] 1.3 만성 심부전으로 명확히 진단되었고 임상 증상이 지난 1개월 동안 안정적임;

- [0070] 1.4 심부전에 대한 표준 치료를 받은 환자는 적어도 1개월 동안 목표 용량 또는 최대 내약 용량에 도달하였거나, 지난 1개월 내에 투여량을 변화시키지 않음;

- [0071] 1.5 피험자 동의서를 이해하고 서명함.

- [0072] 2. 시험약

- [0073] 명칭: 주사용 재조합 인간 뉴레굴린

- [0074] 사양: 250 g/병(vial).

- [0075] 제형: 주사용 동결 건조 분말

- [0076] 투여 경로: 정맥내 점적(點滴)

- [0077] 위약 (투여량 0):
- [0078] 명칭: 동결 건조 제조합 인간 뉴레글린의 부형제
- [0079] 제형: 주사용 동결 건조 분말
- [0080] 투여 경로: 정맥내 점적
- [0081] 3. 투여 경로, 투여량 및 치료 과정을 표 2에 나타내었다.

표 2

- [0082] 투여량, 경로 및 치료 과정

투여량	0 μg/kg/day(위약)	0.3 μg/kg/day
투여 경로	정맥내 점적	
치료 과정	연속 10일간 하루 10 시간	
투여 용량	50 ml	

- [0083] 4. 데이터 수집: 2차원 심장 초음파의 승모판막 유량 스펙트럼(mitral valve flow spectrum)을 11-13일 및 30일의 선별 기간 동안 측정하였다.
- [0084] 5. 결과 및 논의

표 3

	명칭	8001 (0μg/kg)			8002 (0μg/kg)			8003 (0.3μg/kg)			8004 (0.3μg/kg)		
		선별 기간	11-13 일	30 일	선별 기간	11-13 일	30 일	선별 기간	11-13 일	30 일	선별 기간	11-13 일	30 일
수 변	IVRT (ms)	416.51	443.62	476.89	507.56	513.14	545.38	374.31	340.1	345	621.07	609.28	499.08
	DT(ms)	296.76	297.89	315.56	253.85	265.81	293.96	229.08	203.7	179.5	262.28	256.15	255.14

[0085]

[0086]

승모관막 유량 스펙트럼에서 IVRT 및 DT의 수치 변화

[0087]

표 3의 결과는 위약이 투여된 환자들의 IVRT 및 DT 값이 점차적으로 증가한 반면에, NRG가 투여된 환자들의 IVRT 및 DT 값이 확연하게 감소하였음을 나타내며, 이완기 기능의 어느 정도의 개선을 입증한다.

[0088]

상기 나열된 실시예는 본 발명의 보호 범위를 제한하지 않는다. 본 발명의 목적 및 범위에서 벗어나지 않는 한, 통상의 기술자는 본 발명을 조정하거나 변경할 수 있다. 그러므로, 본 발명의 보호 범위는 특정 실시예가 아닌 청구범위에 따라 정의되어야 한다.

서열 목록

<110> Shanghai Zensun Sci & Tech Co., Ltd

<120> Methods and Compositions of Neuregulins for Preventing, Treating or Delaying Preserved Ejection Fraction Cardiac Failure

<160> 1

<170> Patentin Version 3.3

<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
----	----	----