



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201832776 A

(43)公開日：中華民國 107 (2018) 年 09 月 16 日

(21)申請案號：107102933 (22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 01 月 26 日

(51)Int. Cl. : *A61K38/17 (2006.01)* *C07K14/435 (2006.01)*  
*A61P9/00 (2006.01)*

(30)優先權：2017/01/27 日本 2017-013293  
 2017/08/04 日本 2017-151788

(71)申請人：日商捷能密庫斯股份有限公司(日本) GENOMIX CO., LTD. (JP)  
 日本  
 國立大學法人大阪大學(日本) OSAKA UNIVERSITY (JP)  
 日本

(72)發明人：玉井克人 TAMAI, KATSUTO (JP)；澤芳樹 SAWA, YOSHIKI (JP)；宮川繁  
 MIYAGAWA, SHIGERU (JP)；木戶高志 KIDO, TAKASHI (JP)；後藤隆純 GOTO,  
 TAKASUMI (JP)；山崎尊彥 YAMAZAKI, TAKEHIKO (JP)

(74)代理人：洪澄文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：9 項 圖式數：23 共 55 頁

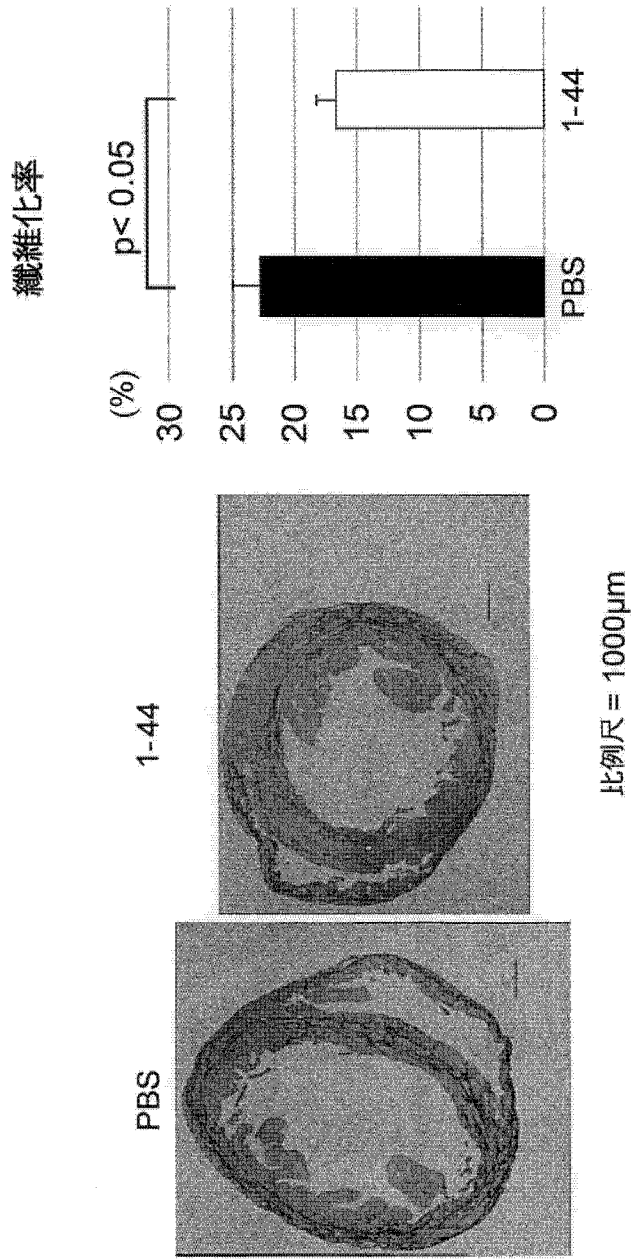
## (54)名稱

心肌病、陳舊性心肌梗塞及慢性心臟衰竭的治療藥物

## (57)摘要

本案發明人等發現具有特定胺基酸序列之 HMGB1 胜肽片段在擴張型心肌病之動物模型顯示心臟功能的改善、心肌細胞肥大的抑制、心肌纖維化的抑制、及血管新生促進的效果，在起因於陳舊性心肌梗塞之缺血性心肌病之動物模型，該特定之 HMGB1 胜肽片段亦顯示心臟功能之改善、心臟擴大的抑制、心肌細胞肥大的抑制、心肌纖維化的抑制、及血管新生促進的效果，及在高血壓性心肌病之動物模型中，該特定之 HMGB1 胜肽片段顯示心肌細胞肥大的抑制及心肌纖維化的抑制效果。依據此等認識，提供一種心肌病及陳舊性心肌梗塞及由此等引起的慢性心臟衰竭的預防及/或治療用的醫藥組合物，其含有具特定之胺基酸序列之 HMGB1 胜肽片段。

指定代表圖：



【第2圖】

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】 心肌病、陳舊性心肌梗塞及慢性心臟衰竭的治療藥物

### 【技術領域】

【0001】 本申請案係關於一種含有HMGB1蛋白質之胜肽片段的用於心肌病、陳舊性心肌梗塞及慢性心臟衰竭的預防及/或治療用的醫藥組合物。

### 【先前技術】

【0002】 心肌病定義為「伴隨心臟功能障礙的心肌病症」，許多情形，伴隨心臟擴大、心肌細胞肥大、心肌纖維化等心臟之結構異常，若持續進行則會呈現慢性心臟衰竭的症狀。繼發性的心肌病有時會由於原因病症的治療而改善，但針對原發性心肌病，尚無根治的治療方法。

【0003】 由於冠狀動脈堵塞導致心肌壞死的心肌梗塞，在先進國家是位於死亡原因之前幾位的心臟病(美國為第1位、日本為第2位)的主要基礎病症。由於診斷技術、心導管治療、冠狀動脈繞道術的進步，急性期治療成績提高，但是在廣範圍梗塞的案例、高度的再灌流障礙的案例、及錯失治療機會的病例等，心臟擴大、心臟肥大進行且變成慢性心臟衰竭的病例也不少見。

【0004】 起因於心肌病、陳舊性心肌梗塞的慢性心臟衰竭變成重症時，現有的慢性心臟衰竭治療藥物(ACE抑制藥、 $\beta$ 阻斷藥等)無法獲得充分的改善效果，有時會有需心臟移植的案例。但是在日本，移植等待期間長達約3年(非專利文獻1)，在等待期間中發生腦梗塞、裝置感染等併發症的病例也不少見。又，即使接受心臟移植，仍有由於之後需繼續服用的免疫抑制劑之副作用導致傳染病風險的增大、發生冠狀動脈病變等併發症等的問題，心臟移植後之10年生存率為約50%(非專利文獻2)。在該狀況下，希望針對心肌病及陳舊性心肌梗塞及由

此等所引起的慢性心臟衰竭開發新的治療藥物。

**【0005】** 近年來，使用間葉系幹細胞的再生醫療受到重視，關於心肌梗塞後慢性心臟衰竭，已有在慢性心肌梗塞的動物模型中，藉由將利用來自卵膜、骨髓、或脂肪組織的間葉系幹細胞作成的細胞片直接移植至心臟，而獲得心臟功能之改善效果的報告(非專利文獻3及專利文獻1)。但是細胞片的移植需要開胸手術，對於患者的負擔大，對於因為高齡等原因而手術困難的患者無法適用。

**【0006】** 又，已有確認損傷組織會將骨髓多功能性幹細胞動員因子放出到血中，誘導損傷組織再生的機制。本案發明人等曾在以前的研究中，發現HMGB1(High mobility group box 1)蛋白質之胜肽片段會使骨髓間葉系幹細胞從骨髓動員到末梢血中，及在心肌梗塞之急性期藉由投予該胜肽片段，來自骨髓之間葉系幹細胞會聚集在梗塞部位及其附近，並帶來心臟功能改善的效果(專利文獻2及3)。

**【0007】** 但是，在心肌梗塞的急性期，由於缺血會導致大量的心肌細胞急速地壞死並引起強烈發炎反應，反觀心肌病一般而言並不發生如此的現象，而是以緩慢進行心臟擴大、心肌細胞肥大、心肌纖維化等結構異常為特徵，兩者的病理生理學有重大差異。又，陳舊性心肌梗塞中，即使心肌細胞之壞死、發炎到一段落，心臟擴大、心臟肥大繼續進行為其特徵。所以，尚不明瞭HMGB1蛋白質之胜肽片段是否能對於心肌病及陳舊性心肌梗塞發揮治療效果。

[先前技術文獻]

[非專利文獻]

**【0008】**

[非專利文獻1] Fukushima et al., "Registry Report on Heart Transplantation in Japan (June 2016),"Circulation Journal (Advance Publication, January 6, 2017, Article ID: CJ-16-0976)

[非專利文獻2] Lund et al., “The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-third Adult Heart Transplantation Report-2016; Focus Theme: Primary Diagnostic Indications for Transplant,” J Heart Lung Transplant. 2016 Oct;35(10):1158-1169

[非專利文獻3] 石兼真，「來自多成長因子分泌型卵膜之間葉系幹細胞片之開發」，2014年6月11日、科學研究費補助事業 研究成果報告書

[專利文獻]

【0009】

[專利文獻1] WO2006/080434

[專利文獻2] WO2012/147470

[專利文獻3] WO2014/065347

## 【發明內容】

(發明欲解決之課題)

【0010】 本申請案之目的為提供對於心肌病及陳舊性心肌梗塞及由此等引起之慢性心臟衰竭之預防及/或治療有效的新穎醫藥。又，本申請案之目的為提供對於伴隨心臟之結構異常及/或功能障礙之心臟病症之預防及/或治療有效的新穎醫藥。

(解決課題之方式)

【0011】 本案發明人等針對HMGB1胜肽片段在心肌病之作用進行了研究，結果發現具有特定之胺基酸序列之HMGB1胜肽片段在擴張型心肌病之動物模型顯示心臟功能之改善、心臟之結構異常(心肌細胞肥大及心肌纖維化)的抑制、及血管新生促進之效果。又，本案發明人等在起因於陳舊性心肌梗塞之缺血性心肌病之動物模型，也發現到該特定之HMGB1胜肽片段顯示心臟功能之改

善、心臟之結構異常(心臟擴大、心肌細胞肥大及心肌纖維化)的抑制、及血管新生促進之效果。再者，本案發明人等在高血壓性心肌病之動物模型中，發現該特定之HMGB1胜肽片段顯示心臟之結構異常(心肌細胞肥大及心肌纖維化)的抑制效果。因此本申請案提供一種心肌病及陳舊性心肌梗塞及由此等引起之慢性心臟衰竭之預防及/或治療用之醫藥組合物，含有該特定之HMGB1胜肽片段。又，該特定之HMGB1胜肽片段在心肌病會抑制心臟之結構異常及/或功能障礙，在陳舊性心肌梗塞會抑制心臟之結構異常及功能障礙。因此本申請案提供一種伴隨心臟之結構異常及/或功能障礙之心臟病症之預防及/或治療用之醫藥組合物，含有該特定之HMGB1胜肽片段。

**【0012】** 亦即，本申請案提供下列發明。

[1] 一種預防及/或治療伴隨心臟之結構異常及/或功能障礙之心臟病症用之醫藥組合物，含有以下(a)至(c)中任一項所述之物質(以下稱為物質A)：

(a) 含有序列編號：1記載之胺基酸序列之HMGB1胜肽片段；

(b) 含有序列編號：1記載之胺基酸序列之1或多數個胺基酸經取代、缺失、插入或加成而得之胺基酸序列，且有刺激細胞遊走之活性之胜肽；及

(c) 含有與序列編號：1記載之胺基酸序列有約80%以上之序列相同度之胺基酸序列，且有刺激細胞遊走之活性之胜肽。

[2] 如[1]之醫藥組合物，其中，伴隨心臟之結構異常及/或功能障礙之心臟病症為心肌病。

[3] 如[2]之醫藥組合物，其中，心肌病為原發性心肌病。

[4] 如[3]之醫藥組合物，其中，原發性心肌病係選自於由擴張型心肌病、肥大型心肌病、狹窄型心肌病及致心律失常型右心室心肌病組成之群組。

[5] 如[2]之醫藥組合物，其中，心肌病係繼發性心肌病。

[6] 如[5]之醫藥組合物，其中，繼發性心肌病係選自於由缺血性心肌病、高

血壓性心肌病、瓣膜症性心肌病、藥劑誘發性心肌病、酒精性心肌病、粒腺體心肌病、起因於心臟肉瘤病之心肌病、起因於心臟類澱粉變性病之心肌病、起因於心肌炎之心肌病、起因於肌肉萎縮症之心肌病、起因於心臟法布瑞氏症 (Fabry disease) 之心肌病及周產期心肌病組成之群組。

[7] 如[1]之醫藥組合物，其中，伴隨心臟之結構異常及/或功能障礙之心臟病症為陳舊性心肌梗塞。

[8] 一種預防及/或治療起因於心肌病或陳舊性心肌梗塞之慢性心臟衰竭用之醫藥組合物，含有物質A。

[9] 一種抑制在心肌病或陳舊性心肌梗塞之患者中之選自於由心臟擴大、心肌細胞肥大及心肌纖維化組成之群組中之心臟之結構異常用之醫藥組合物，含有物質A。

[10] 一種預防及/或治療選自於由擴張型心肌病、缺血性心肌病及高血壓性心肌病組成之群組中之心肌病用之醫藥組合物，含有物質A。

[11] 如[10]之醫藥組合物，其中，缺血性心肌病係起因於陳舊性心肌梗塞。

[12] 一種起因於選自於由擴張型心肌病、缺血性心肌病及高血壓性心肌病組成之群組中之心肌病之慢性心臟衰竭之預防及/或治療用之醫藥組合物，含有物質A。

[13] 如[12]之醫藥組合物，其中，缺血性心肌病係起因於陳舊性心肌梗塞。

[14] 如[12]之醫藥組合物，其中，慢性心臟衰竭係起因於擴張型心肌病或缺血性心肌病。

[15] 如[14]之醫藥組合物，其中，起因於擴張型心肌病或缺血性心肌病之慢性心臟衰竭為HFrEF。

[16] 如[12]之醫藥組合物，其中，慢性心臟衰竭係起因於高血壓性心肌病。

[17] 如[16]之醫藥組合物，其中，起因於高血壓性心肌病之慢性心臟衰竭為

HFpEF。

[A1] 一種預防及/或治療伴隨心臟之結構異常及/或功能障礙之心臟病症之方法，包括對於對象投予有效量之物質A之步驟。

[A2] 如[A1]的方法，其中伴隨心臟之結構異常及/或功能障礙之心臟病症為心肌病。

[A3] 如[A2]的方法，其中，心肌病為原發性心肌病。

[A4] 如[A3]的方法，其中，原發性心肌病係選自於由擴張型心肌病、肥大型心肌病、狹窄型心肌病及致心律失常型右心室心肌病組成之群組。

[A5] 如[A2]的方法，其中，心肌病為繼發性心肌病。

[A6] 如[A5]的方法，其中，繼發性心肌病係選自於由缺血性心肌病、高血壓性心肌病、瓣膜症性心肌病、藥劑誘發性心肌病、酒精性心肌病、粒腺體心肌病、起因於心臟肉瘤病之心肌病、起因於心臟類澱粉變性病之心肌病、起因於心肌炎之心肌病、起因於肌肉萎縮症之心肌病、起因於心臟法布瑞氏症之心肌病及周產期心肌病組成之群組。

[A7] 如[A1]的方法，其中，伴隨心臟之結構異常及/或功能障礙之心臟病症係陳舊性心肌梗塞。

[A8] 一種預防及/或治療起因於心肌病或陳舊性心肌梗塞之慢性心臟衰竭之方法，包括對於對象投予有效量之物質A之步驟。

[A9] 一種抑制在心肌病或陳舊性心肌梗塞之患者之選自於由心臟擴大、心肌細胞肥大及心肌纖維化組成之群組中之心臟之結構異常之方法，包括對於對象投予有效量之物質A之步驟。

[A10] 一種預防及/或治療選自於由擴張型心肌病、缺血性心肌病及高血壓性心肌病組成之群組中之心肌病之方法，包括對於對象投予有效量之物質A之步驟。



[A11] 如[A10]的方法，其中，缺血性心肌病係起因於陳舊性心肌梗塞。

[A12] 一種預防及/或治療起因於選自於由擴張型心肌病、缺血性心肌病及高血壓性心肌病組成之群組中之心肌病之慢性心臟衰竭之方法，包括對於對象投予有效量之物質A之步驟。

[A13] 如[A12]的方法，其中，缺血性心肌病係起因於陳舊性心肌梗塞。

[A14] 如[A12]的方法，其中，慢性心臟衰竭係起因於擴張型心肌病或缺血性心肌病。

[A15] 如[A14]的方法，其中，起因於擴張型心肌病或缺血性心肌病之慢性心臟衰竭為HFrEF。

[A16] 如[A12]的方法，其中，慢性心臟衰竭係起因於高血壓性心肌病。

[A17] 如[A16]的方法，其中，起因於高血壓性心肌病之慢性心臟衰竭為HFpEF。

[B1] 一種物質A，係使用在預防及/或治療伴隨心臟之結構異常及/或功能障礙之心臟病症。

[B2] 如[B1]之物質A，其中，伴隨心臟之結構異常及/或功能障礙之心臟病症為心肌病。

[B3] 如[B2]之物質A，其中，心肌病為原發性心肌病。

[B4] 如[B3]之物質A，其中，原發性心肌病係選自於由擴張型心肌病、肥大型心肌病、狹窄型心肌病及致心律失常型右心室心肌病組成之群組。

[B5] 如[B2]之物質A，其中，心肌病為繼發性心肌病。

[B6] 如[B5]之物質A，其中，繼發性心肌病係選自於由缺血性心肌病、高血壓性心肌病、瓣膜症性心肌病、藥劑誘發性心肌病、酒精性心肌病、粒腺體心肌病、起因於心臟肉瘤病之心肌病、起因於心臟類澱粉變性病之心肌病、起因於心肌炎之心肌病、起因於肌肉萎縮症之心肌病、起因於心臟法布瑞氏症之心

肌病及周產期心肌病組成之群組。

[B7] 如[B1]之物質A，其中，伴隨心臟之結構異常及/或功能障礙之心臟病症為陳舊性心肌梗塞。

[B8] 一種物質A，係使用於預防及/或治療之起因於心肌病或陳舊性心肌梗塞之慢性心臟衰竭。

[B9] 一種物質A，係使用於抑制在心肌病或陳舊性心肌梗塞之患者中之選自於由心臟擴大、心肌細胞肥大及心肌纖維化組成之群組中之心臟之結構異常。

[B10] 一種物質A，係使用於預防及/或治療選自於由擴張型心肌病、缺血性心肌病及高血壓性心肌病組成之群組中之心肌病。

[B11] 如[B10]之物質A，其中，缺血性心肌病係起因於陳舊性心肌梗塞。

[B12] 一種物質A，係使用於預防及/或治療起因於選自於由擴張型心肌病、缺血性心肌病及高血壓性心肌病組成之群組中之心肌病之慢性心臟衰竭。

[B13] 如[B12]之物質A，其中，缺血性心肌病係起因於陳舊性心肌梗塞。

[B14] 如[B12]之物質A，其中，慢性心臟衰竭係起因於擴張型心肌病或缺血性心肌病。

[B15] 如[B14]之物質A，其中，起因於擴張型心肌病或缺血性心肌病之慢性心臟衰竭為HFrEF。

[B16] 如[B12]之物質A，其中，慢性心臟衰竭係起因於高血壓性心肌病。

[B17] 如[B16]之物質A，其中，起因於高血壓性心肌病之慢性心臟衰竭為HFpEF。

[C1] 一種物質A之用途，係使用在製造用以預防及/或治療伴隨心臟之結構異常及/或功能障礙之心臟病症之醫藥。

[C2] 如[C1]之用途，其中，伴隨心臟之結構異常及/或功能障礙之心臟病症為心肌病。

[C3] 如[C2]之用途，其中，心肌病為原發性心肌病。

[C4] 如[C3]之用途，其中，原發性心肌病係選自於由擴張型心肌病、肥大型心肌病、狹窄型心肌病及致心律失常型右心室心肌病組成之群組。

[C5] 如[C2]之用途，其中，心肌病為繼發性心肌病。

[C6] 如[C5]之用途，其中，繼發性心肌病係選自於由缺血性心肌病、高血壓性心肌病、瓣膜症性心肌病、藥劑誘發性心肌病、酒精性心肌病、粒腺體心肌病、起因於心臟肉瘤病之心肌病、起因於心臟類澱粉變性病之心肌病、起因於心肌炎之心肌病、起因於肌肉萎縮症之心肌病、起因於心臟法布瑞氏症之心肌病及周產期心肌病組成之群組。

[C7] 如[C1]之用途，其中，伴隨心臟之結構異常及/或功能障礙之心臟病症為陳舊性心肌梗塞。

[C8] 一種物質A之用途，係使用於製造用於預防及/或治療起因於心肌病或陳舊性心肌梗塞之慢性心臟衰竭之醫藥。

[C9] 一種物質A之用途，係用以製造用於抑制在心肌病或陳舊性心肌梗塞之患者中之選自於由心臟擴大、心肌細胞肥大及心肌纖維化組成之群組中之心臟之結構異常之醫藥。

[C10] 一種物質A之用途，係用以製造用於預防及/或治療選自於由擴張型心肌病、缺血性心肌病及高血壓性心肌病組成之群組中之心肌病之醫藥。

[C11] 如[C10]之用途，其中，缺血性心肌病係起因於陳舊性心肌梗塞。

[C12] 一種物質A之用途，係用以製造用於預防及/或治療起因於選自於由擴張型心肌病、缺血性心肌病及高血壓性心肌病組成之群組中之心肌病之慢性心臟衰竭之醫藥。

[C13] 如[C12]之用途，其中，缺血性心肌病係起因於陳舊性心肌梗塞。

[C14] 如[C12]之用途，其中，慢性心臟衰竭起因於擴張型心肌病或缺血性心

肌病。

[C15] 如[C14]之用途，其中，起因於擴張型心肌病或缺血性心肌病之慢性心臟衰竭為HF<sub>r</sub>EF。

[C16] 如[C12]之用途，其中，慢性心臟衰竭起因於高血壓性心肌病。

[C17] 如[C16]之用途，其中，起因於高血壓性心肌病之慢性心臟衰竭為HF<sub>p</sub>EF。

### 【圖式簡單說明】

#### 【0013】

第1圖顯示HMGB1胜肽(1-44)群與PBS群在投予前、投予4週後及投予6週後之左心室射出率(LVEF)、左心室舒張末期徑(LVDd)及左心室收縮末期徑(LVDs)之測定結果之圖表。

第2圖顯示心肌組織切片之天狼星紅(sirius red)染色之結果之照片、及染色陽性區之百分比之圖表。

第3圖顯示心肌組織切片之免疫染色(抗CD31抗體)之結果之照片、及毛細血管密度之圖表。

第4圖顯示心肌組織切片之PAS染色之結果之照片、及心肌細胞之短徑之圖表。

第5圖顯示使用針對PDGFR $\alpha$ 及CD29之抗體之免疫染色之結果之照片。

PDGFR $\alpha$ ：綠色、CD29：紅色、DAPI：藍色。

第6圖顯示HMGB1胜肽(1-44)群及PBS群中之PDGFR $\alpha$ 陽性且CD29陽性之細胞之數目之圖表。

第7圖顯示以RT-PCR解析之VEGF及TSG-6之表現量之圖表。RQ：相對量。

第8圖顯示利用電子顯微鏡觀察心肌細胞之結果之照片。

第9圖顯示HMGB1胜肽(1-44)群與PBS群在投予前到投予14週後的左心室射出率

(LVEF)之測定結果之圖表。

第10圖顯示HMGB1胜肽(1-44)群與PBS群之生存率之圖表。

第11圖顯示HMGB1胜肽(1-44)群與PBS群在投予前及投予4週後之左心室射出率(LVEF)之測定結果之圖表。

第12圖顯示HMGB1胜肽(1-44)群與PBS群在投予前及投予4週後之左心室舒張末期徑(LVDd)及左心室收縮末期徑(LVDs)之測定結果之圖表。

第13圖顯示HMGB1胜肽(1-44)群與PBS群在投予前至投予4週後之左心室射出率(LVEF)之測定結果之圖表。

第14圖顯示心肌組織切片之天狼星紅(sirius red)染色之結果之照片、及染色陽性區之百分比之圖表。

第15圖顯示在梗塞交界部的毛細血管密度之圖表、及在梗塞交界部之von-Willbrand因子染色之結果之照片。

第16圖顯示心肌細胞在梗塞交界部之短徑之圖表。

第17圖顯示HMGB1胜肽(1-44)群之梗塞交界部的螢光免疫染色圖像。PDGFR $\alpha$ ：綠色、CD90：紅色、DAPI：藍色。(a)之箭頭代表PDGFR $\alpha$ 與CD90之雙重陽性細胞(double positive cell)，虛線代表梗塞交界部。

第18圖顯示HMGB1胜肽(1-44)群之梗塞交界部之螢光免疫染色圖像。PDGFR $\alpha$ ：綠色、CD105：紅色、DAPI：藍色。箭頭代表PDGFR $\alpha$ 與CD105之雙重陽性細胞(double positive cell)，虛線代表梗塞交界部。

第19圖顯示HMGB1胜肽(1-44)群及PBS群之梗塞交界部之螢光免疫染色圖像。PDGFR $\alpha$ ：綠色、CD90：紅色、DAPI：藍色。箭頭代表PDGFR $\alpha$ 與CD90之雙重陽性細胞(double positive cell)，虛線代表梗塞交界部。

第20圖顯示15週大時之心臟重量之圖表。

第21圖顯示從6週大時至15週大時之LVAWd之變化之圖表(惟9及14週大時未實

施測定)。

第22圖顯示心肌組織切片之天狼星紅(sirius red)染色之結果之照片。

第23圖顯示心肌組織切片中之天狼星紅(sirius red)染色陽性區之百分比之圖表。

除了圖中顯示者以外，群間之p值皆在0.1以上。

### 【實施方式】

【0014】 本申請案提供一種伴隨心臟之結構異常及/或功能障礙之心臟病症之預防及/或治療用之醫藥組合物，含有具序列編號：1記載之胺基酸序列之HMGB1胜肽片段。

【0015】 本申請案中，心臟之結構異常可列舉心臟擴大、心肌細胞肥大、心肌纖維化等，但不限定於此等。於一態樣中，心臟之結構異常選自於由心臟擴大、心肌細胞肥大及心肌纖維化組成之群組。

【0016】 本申請案中，心臟之功能障礙(心臟功能障礙)意指心臟將血液取進並送出之泵浦功能之障礙，包括收縮功能障礙及舒張功能障礙。於一態樣中，心臟之功能障礙選自於由收縮功能障礙及舒張功能障礙組成之群組。於其他態樣中，心臟之功能障礙選自於由心室之收縮功能障礙及舒張功能障礙組成之群組。於其他態樣中，心臟之功能障礙選自於由左心室之收縮功能障礙及舒張功能障礙組成之群組。

【0017】 本申請案提供一種心肌病之預防及/或治療用之醫藥組合物，含有具序列編號：1記載之胺基酸序列之HMGB1胜肽片段。

【0018】 本申請案中，「心肌病」係指伴隨心臟功能障礙之心肌病症。又，心肌病時常伴隨心臟擴大、心肌細胞肥大、心肌纖維化等心臟之結構異常。

【0019】 心肌病之中，沒有高血壓、冠動脈病症等明確的原因，病灶位在心肌者稱為原發性心肌病，原因或與全身病症的關連明確者稱為繼發性心肌病。

【0020】 原發性心肌病可列舉擴張型心肌病、肥大型心肌病、狹窄型心肌病、致心律失常型右心室心肌病、無法分類型心肌病，但不限定於此等。「擴張型心肌病」的特徵為左心室擴大及左心室收縮功能障礙，指沒有合併可能引起瀰漫性之收縮障礙之異常負荷狀況(高血壓、瓣膜症)及冠動脈病症之的病症。

【0021】 繼發性心肌病可列舉缺血性心肌病、高血壓性心肌病、瓣膜症性心肌病、藥劑誘發性心肌病、酒精性心肌病、粒腺體心肌病、起因於心臟肉瘤病之心肌病、起因於心臟類澱粉變性病之心肌病、起因於心肌炎之心肌病、起因於肌肉萎縮症之心肌病、起因於心臟法布瑞氏症(Fabry disease)之心肌病、周產期心肌病，但不限定於此等。於一態樣中，起因於肌肉萎縮症之心肌病，係起因於Duchenne型、Becker型或Emery-Dreifuss型肌肉萎縮症之心肌病。

【0022】 本申請案中，「缺血性心肌病」係指起因於缺血性心臟病症(陳舊性心肌梗塞或狹心症)而呈現心臟擴大及心肌收縮功能之障礙之病症。HMGB1 胜肽片段具有心臟擴大的抑制效果及心肌收縮功能之改善效果，因此能夠預防及/或治療缺血性心肌病。於一態樣中，缺血性心肌病係起因於陳舊性心肌梗塞。

【0023】 本申請案中，「高血壓性心肌病」係起因於高血壓而呈心肌細胞肥大及心臟之功能障礙(舒張功能障礙或收縮功能障礙)之病症。HMGB1 胜肽片段能抑制起因於高血壓而發生的心肌細胞肥大，故能夠預防及/或治療高血壓性心肌病。

【0024】 本申請案中，「醫藥組合物」之用語和「醫藥」、「藥劑」或「藥學的組合物」能夠互換使用。

【0025】 本申請案提供一種陳舊性心肌梗塞治療用之醫藥組合物，含有具序列編號：1記載之胺基酸序列之HMGB1 胜肽片段。

【0026】 本申請案中，「陳舊性心肌梗塞」，在人類是指心肌梗塞發病後經30日以上之狀態(在大鼠係指心肌梗塞發病後經14日以上之狀態)，且伴隨心臟

之結構異常或功能障礙者。陳舊性心肌梗塞之中，伴隨心臟擴大及心臟之收縮功能障礙者屬於缺血性心肌病。又，本申請案中，「陳舊性心肌梗塞」之用語與「慢性期心肌梗塞」互換使用。

**【0027】** 本申請案之HMGB1胜肽片段，在陳舊性心肌梗塞會抑制心臟之結構異常(例如心臟擴大、心肌細胞肥大及心肌纖維化)及功能障礙(例如收縮功能障礙)。又，本申請案之HMGB1胜肽片段，在心肌病會發揮心臟功能(例如收縮功能)之改善效果。因此本申請案之HMGB1胜肽片段，據認為可對於陳舊性心肌梗塞、心肌病等伴隨心臟之結構異常及/或功能障礙之心臟病症發揮廣泛地治療效果。

**【0028】** 本申請案提供一種起因於心肌病之慢性心臟衰竭之預防及/或治療用之醫藥組合物，含有具序列編號：1記載之胺基酸序列之HMGB1胜肽片段。

**【0029】** 心肌病若隨著其病情進行導致心臟功能降低，會到達慢性心臟衰竭的狀態。HMGB1胜肽片段會抑制在心肌病的心臟擴大、心肌細胞肥大、心肌纖維化等心臟之結構異常，能改善心臟功能，所以能夠預防及/或治療心肌病患者之慢性心臟衰竭。

**【0030】** 本申請案提供一種起因於陳舊性心肌梗塞之慢性心臟衰竭之預防及/或治療用之醫藥組合物，含有具序列編號：1記載之胺基酸序列之HMGB1胜肽片段。

**【0031】** 陳舊性心肌梗塞若由於心臟之結構異常之進行等導致心臟功能降低，會到達慢性心臟衰竭之狀態。HMGB1胜肽片段在陳舊性心肌梗塞會抑制心臟擴大、心肌細胞肥大、心肌纖維化等心臟之結構異常，能改善心臟功能，故能預防及/或治療陳舊性心肌梗塞之患者之慢性心臟衰竭。

**【0032】** 本申請案中，「慢性心臟衰竭」，係指由於慢性之心肌障礙導致心臟之泵浦功能降低，無法絕對地或相對地打出符合末梢主要臟器之需氧量的



血液量的狀態，於肺、體靜脈系或兩系統造成鬱血且日常生活出現障礙的病態。慢性心臟衰竭之類型可列舉左心室射出率降低的心臟衰竭(heart failure with reduced ejection fraction: HFrEF)及左心室射出率維持的心臟衰竭(heart failure with preserved ejection fraction: HFpEF)。HFrEF的特徵為左心室射出率未達50%，有收縮功能障礙。HFpEF的特徵為左心室射出率為50%以上，有舒張功能障礙。於一態樣中，HFrEF起因於擴張型心肌病或缺血性心肌病。於一態樣中，HFpEF起因於高血壓性心肌病。

**【0033】** 又，本申請案提供一種抑制心肌病及陳舊性心肌梗塞之患者中之選自於由心臟擴大、心肌細胞肥大及心肌纖維化組成之群組之心臟之結構異常用之醫藥組合物，含有具序列編號：1記載之胺基酸序列之HMGB1胜肽片段。於一態樣中，本申請案之醫藥組合物係為了在心肌病及陳舊性心肌梗塞之患者中，(i)抑制選自於由心臟擴大、心肌細胞肥大及心肌纖維化組成之群組中之心臟之結構異常、(ii)促進心臟之血管新生、或(iii)改善心臟之收縮功能或舒張功能而使用。心臟之收縮功能，例如心室之收縮功能，例如左心室之收縮功能，但不限定於此等。心臟之舒張功能，例如心室之舒張功能，例如左心室之舒張功能，但不限定於此等。

**【0034】** 本申請案中，具有序列編號：1記載之胺基酸序列之HMGB1胜肽片段，係指由HMGB1蛋白質之一部分形成之胜肽，含有序列編號：1記載之胺基酸序列之胜肽。如此的胜肽，可將編碼該胜肽之DNA納入到適當的表現系而以基因重組體(recombinant)的形式獲得，或亦能夠以人工合成。

**【0035】** 本申請案中，HMGB1蛋白質可列舉含有序列編號：2記載之胺基酸序列之蛋白質、及由含有序列編號：3記載之鹼基序列之DNA編碼之蛋白質，但不限定於此等。

**【0036】** 本申請案中，具有序列編號：1記載之胺基酸序列之HMGB1胜肽

片段可列舉如下，但不限定於此等：

1) 含有序列編號：1記載之胺基酸序列，且有刺激細胞遊走之活性之HMGB1胜肽片段；

2) 含有序列編號：1記載之胺基酸序列，且有刺激間葉系幹細胞遊走之活性之HMGB1胜肽片段；

3) 由序列編號：1記載之胺基酸序列形成之HMGB1胜肽片段。

**【0037】** 本申請案中，做為因HMGB1胜肽片段而刺激遊走的細胞而言，可列舉骨髓細胞或來自骨髓的細胞(例如骨髓幹細胞或來自骨髓的幹細胞)，但不限定於此。

**【0038】** 本申請案中，「骨髓細胞」係指骨髓內存在的細胞，另一方面，「來自骨髓的細胞」，係指從骨髓動員到骨髓外的「骨髓細胞」。又，「骨髓細胞」也可包括骨髓內存在的幹細胞及前驅細胞等未分化的細胞。

**【0039】** 本申請案中，做為因HMGB1胜肽片段而刺激遊走的細胞而言，也可列舉間葉系幹細胞，但不限定於此。「間葉系幹細胞」係指從骨髓或其他組織(血液，例如臍帶血，及皮膚、脂肪、牙髓等)收集，能使用培養皿(塑膠或玻璃製)以附著細胞的形式培養、增殖，且具有分化為骨、軟骨、脂肪、肌肉等間葉系組織之分化能力的細胞。於一態樣中，間葉系幹細胞也具有分化為上皮系組織、神經組織的分化能力。本申請案中，間葉系幹細胞不僅是狹義的幹細胞，也能夠包括前驅細胞之不均勻的細胞集團的形式存在，於培養條件下除了狹義的幹細胞及/或前驅細胞，也可包括已分化的細胞。於一態樣中，間葉系幹細胞可僅由狹義的幹細胞構成，也可為由多數種前驅細胞構成的細胞集團。

**【0040】** 本發明中，前驅細胞定義為具有朝血液系以外之特定組織細胞分化之單方向分化能力的細胞，包括具有分化為間葉系組織、上皮系組織、神經組織、實質臟器、血管內皮之分化能力的細胞。

【0041】 本申請案中，作為因HMGB1胜肽片段而刺激遊走的細胞而言，可列舉骨髓間葉系幹細胞及來自骨髓之間葉系幹細胞，但不限定於此。「骨髓間葉系幹細胞」，係指存在於骨髓內之細胞，由骨髓收集，能使用培養皿(塑膠或玻璃製)以附著細胞的形式培養、增殖，且有分化為骨、軟骨、脂肪、肌肉等間葉系組織、及神經組織、上皮組織之分化能力之特徵的細胞。本申請案中，「骨髓間葉系幹細胞」之用語，能夠與「骨髓間葉系間質細胞」、「骨髓多功能性幹細胞」及「骨髓多功能性間質細胞」互換使用。

【0042】 又，「來自骨髓之間葉系幹細胞」，係指從骨髓動員到骨髓外的骨髓間葉系幹細胞，是能利用末梢血採血、進而能利用從脂肪等間葉系組織、皮膚等上皮組織、腦等神經組織收集取得之細胞。本申請案中，「來自骨髓之間葉系幹細胞」之用語，能夠與「來自骨髓之間葉系間質細胞」、「來自骨髓之多功能性幹細胞」及「來自骨髓之多功能性間質細胞」互換使用。

【0043】 又，骨髓間葉系幹細胞及來自骨髓之間葉系幹細胞，也具有收集後直接、或使其一度附著於培養皿的細胞的形式投予至生物體之損傷部，而分化為例如構成皮膚之角質細胞等上皮系組織、構成腦之神經系之組織之分化能力的特徵。

【0044】 骨髓間葉系幹細胞及來自骨髓之間葉系幹細胞，宜具有分化為骨母細胞(可藉由認定誘導分化及鈣沈澱等來鑑別)、軟骨細胞(愛爾新藍(alcian blue)染色陽性、番紅-O染色陽性等來鑑別)、脂肪細胞(蘇丹III染色陽性等來鑑別)之能力，除此以外尚具有分化為例如纖維母細胞、平滑肌細胞、骨骼肌細胞、基質細胞、肌腱細胞等間葉系細胞、神經細胞、色素細胞、表皮細胞、毛囊細胞(表現細胞角蛋白家族、髮角蛋白家族等)、上皮系細胞(例如表皮角化細胞、腸道上皮細胞表現細胞角蛋白家族等)、內皮細胞、進而分化為肝臟、腎臟、胰臟等實質臟器細胞之能力較佳，但分化後之細胞不限定於上述細胞。

【0045】 人類間葉系幹細胞之標記，可列舉PDGFR $\alpha$ 陽性、PDGFR $\beta$ 陽性、Lin陰性、CD45陰性、CD44陽性、CD90陽性、CD29陽性、Flk-1陰性、CD105陽性、CD73陽性、CD90陽性、CD71陽性、Stro-1陽性、CD106陽性、CD166陽性、CD31陰性、CD271陽性、CD11b陰性之全部或一部分，但不限定於此。

【0046】 小鼠間葉系幹細胞之標記，可列舉CD44陽性、PDGFR $\alpha$ 陽性、PDGFR $\beta$ 陽性、CD45陰性、Lin陰性、Sca-1陽性、c-kit陰性、CD90陽性、CD105陽性、CD29陽性、Flk-1陰性、CD271陽性、CD11b陰性之全部或一部分，但不限定於此等。

【0047】 大鼠間葉系幹細胞之標記，可列舉PDGFR $\alpha$ 陽性、CD44陽性、CD54陽性、CD73陽性、CD90陽性、CD105陽性、CD29陽性、CD271陽性、CD31陰性、CD45陰性之全部或一部分，但不限定於此等。

【0048】 本申請案中，作為因HMGB1胜肽片段而刺激遊走的細胞而言，尚可列舉PDGFR $\alpha$ 陽性細胞，但不限於此。作為因HMGB1胜肽片段而刺激遊走的PDGFR $\alpha$ 陽性細胞而言，可列舉為PDGFR $\alpha$ 陽性之間葉系幹細胞、PDGFR $\alpha$ 陽性之來自骨髓之間葉系幹細胞、PDGFR $\alpha$ 陽性之來自骨髓之細胞，利用骨髓收集(骨髓細胞收集)或由末梢血採血獲得之血液中之單核球區分細胞培養，而以附著細胞的形式獲得之細胞等，但不限定於此等。PDGFR $\alpha$ 陽性之間葉系幹細胞之例，可列舉PDGFR $\alpha$ 及CD44為陽性之細胞、PDGFR $\alpha$ 及CD90為陽性之細胞、PDGFR $\alpha$ 及CD105為陽性之細胞、PDGFR $\alpha$ 及CD29為陽性之細胞等。於一態樣中，PDGFR $\alpha$ 陽性之間葉系幹細胞也可以是CD44為陰性的細胞。

【0049】 本申請案之醫藥組合物中，也可使用將具有序列編號：1記載之胺基酸序列之HMGB1胜肽片段替換為含有在序列編號：1記載之胺基酸序列中有1個以上之胺基酸殘基經改變(取代、缺失、插入或加成)之胺基酸序列，且有刺激細胞遊走之活性之胜肽，或同時使用具有序列編號：1記載之胺基酸序列之

HMGB1胜肽片段及含有在序列編號：1記載之胺基酸序列中有1個以上之胺基酸殘基經改變(取代、缺失、插入或加成)之胺基酸序列，且有刺激細胞遊走之活性之胜肽。該胜肽例如下列所示者，但不限於此等：

i) 含有在序列編號：1記載之胺基酸序列中之1或多數個(例如1個~10個、1個~9個、1個~8個、1個~7個、1個~6個、1個~5個、1個~4個、1個~3個、或1個或2個)胺基酸經取代、缺失、插入或加成而得之胺基酸序列，且有刺激細胞遊走之活性之胜肽；

ii) 由在序列編號：1記載之胺基酸序列中有1或多數個(例如1個~10個、1個~9個、1個~8個、1個~7個、1個~6個、1個~5個、1個~4個、1個~3個、或1個或2個)胺基酸經取代、缺失、插入或加成而得之胺基酸序列形成，且有刺激細胞遊走之活性之胜肽；

iii) 含有與序列編號：1記載之胺基酸序列有約80%以上，例如約85%以上、約90%以上、約91%以上、約92%以上、約93%以上、約94%以上、約95%以上、約96%以上、約97%以上、約98%以上或約99%以上之序列相同度之胺基酸序列，且有刺激細胞遊走之活性之胜肽；

iv) 由與序列編號：1記載之胺基酸序列有約80%以上，例如約85%以上、約90%以上、約91%以上、約92%以上、約93%以上、約94%以上、約95%以上、約96%以上、約97%以上、約98%以上或約99%以上之序列相同度之胺基酸序列形成，且有刺激細胞遊走之活性之胜肽。

又，作為因該等胜肽而刺激遊走之細胞而言，可列舉間葉系幹細胞、來自骨髓之間葉系幹細胞、PDGFR $\alpha$ 陽性細胞、PDGFR $\alpha$ 陽性之間葉系幹細胞、PDGFR $\alpha$ 陽性之來自骨髓之間葉系幹細胞、及PDGFR $\alpha$ 陽性之來自骨髓之細胞，且由骨髓收集(骨髓細胞收集)或由末梢血採血獲得之血液中之單核球區分細胞培養，而以附著細胞的形式獲得之細胞等，但不限定於此等。

**【0050】** 為了治療、預防於本說明書記載之病症、症狀，將本申請案之胜肽、含有此胜肽之醫藥組合物(以下稱為胜肽等)之有效量，對於對象投予。

**【0051】** 本申請案中，有效量係指對於本說明書記載之病症、症狀之治療、預防為充分的量。本申請案中，治療包括減輕、延遲、阻止、改善、寬解、治癒、完全治癒等，但不限定於此等。本申請案中，預防包括減輕、延遲、阻止等，但不限定於此等。

**【0052】** 本申請案中，對象無特殊限制，可列舉哺乳類、鳥類、魚類等。哺乳類可列舉人類或非人類動物，例如:人類、小鼠、大鼠、猴、豬、貓、兔、倉鼠、天竺鼠、牛、羊、鯨等，但不限定於此等。本申請案中，「對象」之用語係和「患者」、「個體」及「動物」互換使用。

**【0053】** 本申請案之胜肽等的投予部位無限制，投予到組織之有結構性或功能性異常之部位或其附近、與此等不同之部位(此等以外之部位)、離開組織之有結構性或功能性異常之部位、位於距組織之有結構性或功能性異常之部位為遠位之部位、或對於組織之有結構性或功能性異常之部位為遠位且異處之部位等各種部位，本申請案之胜肽等皆能夠發揮其效果。

**【0054】** 例如藉由對於心臟之有結構性或功能性異常之部位或其附近、投予本申請案之胜肽等，使細胞(例如間葉系幹細胞)動員到投予部位，會誘發或促進心臟組織之再生或心臟之結構性或功能性異常之改善。又，例如藉由對與心臟之有結構性或功能性異常之部位或其附近不同之部位投予本申請案之胜肽等，骨髓細胞(例如骨髓間葉系幹細胞)從骨髓經由末梢循環動員到心臟之有結構性或功能性異常之部位、其附近等，會誘發或促進心臟組織之再生或心臟之結構性或功能性異常之改善。在此，「末梢循環」也稱為「血液循環」、「末梢循環血流」。

**【0055】** 又，本申請案之胜肽等，即使投予至與心臟組織不同組織、遠離

心臟組織的組織、位於距心臟組織為遠位之組織、或對於心臟組織為遠位且位於異處之組織等各種組織，亦能發揮其效果。亦即，本申請案之胜肽等可有效利用在將從體外難以直接投予藥劑的心臟組織再生，或心臟之結構性或功能性異常改善。

**【0056】** 本申請案之胜肽等的投予方法，可列舉經口投予或非經口投予，非經口投予方法，可列舉血管內投予(動脈內投予、靜脈內投予等)、肌肉內投予、皮下投予、皮內投予、腹腔內投予、經鼻投予、經肺投予、經皮投予等，但不限定於此等。又，本申請案之胜肽等可藉由注射投予，例如：靜脈內注射、肌肉內注射、腹腔內注射、皮下注射等而全身或局部的(例如：皮下、皮內、皮膚表面、眼球或眼瞼結膜、鼻腔黏膜、口腔內及消化管黏膜、陰道、子宮內黏膜、或損傷部位等)投予。

**【0057】** 又，也可將本申請案之胜肽等替換為使用分泌本申請案之胜肽之細胞、插入了編碼該胜肽之DNA的基因治療用載體、及含有此載體之醫藥組合物。

**【0058】** 又，投予方法可依患者之年齡、症狀適當選擇。投予本申請案之胜肽時，例如：每一次投予可在每1kg體重投予0.000001mg至1000mg之範圍選擇投予量。或例如在每名患者投予0.00001至100000mg/body之範圍選擇投予量。投予分泌本申請案之胜肽之細胞、插入了編碼該胜肽之DNA之基因治療用載體時，亦能夠以使該胜肽之量成為上述範圍內的方式投予。但是本申請案之醫藥組合物不限制於該等投予量。

**【0059】** 本申請案之醫藥組合物可依常法進行製劑(例如：Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, U.S.A)，也可同時含有醫藥上可容許之擔體、添加物。例如界面活性劑、賦形劑、著色料、著香料、保存料、安定劑、緩衝劑、懸浮劑、等張化劑、黏結劑、崩散劑、

滑澤劑、流動性促進劑、矯味劑等，但不限於此，可適當使用其他常用之擔體。具體而言，可列舉輕質無水矽酸、乳糖、結晶纖維素、甘露醇、澱粉、羧甲基纖維素鈣、羧甲基纖維素鈉、羥丙基纖維素、羥丙基甲基纖維素、聚乙烯基縮醛二乙胺基乙酸酯、聚乙烯基吡咯烷酮、明膠、中鏈脂肪酸三酸甘油酯、聚氧乙烯硬化蓖麻油60、白糖、羧基甲基纖維素、玉米澱粉、無機鹽類等。

【0060】 又，本說明書引用的全部先前技術文獻作為參照納入於本說明書內。

【0061】 本發明進一步利用下列實施例例示，但不限定於此等。

[實施例]

【0062】 實施例1

HMGB1胜肽片段對於擴張型心肌病之有效性的評價

【0063】 (1) 材料及方法

由日本SLC取得擴張型心肌病模型動物之J2N-k倉鼠(18週大、雄性、共計20隻)，馴化2週後，用於實驗。J2N-k倉鼠，因為 $\delta$ -肌聚糖( $\delta$ -sarcoglycan)基因的缺失變異，自然發生擴張型心肌病(具體而言，5週大前後開始心肌細胞脫落及纖維化，約20週大呈現心臟擴大及心臟功能障礙，最終約1年因為鬱血性心臟衰竭死亡。J Biochem. 2003 Aug;134(2):269-76)。又，利用固相法化學合成來自人類之由HMGB1蛋白質之胺基酸殘基1-44(序列編號：1)形成的胜肽。以下稱該胜肽為HMGB1胜肽(1-44)，在實施例所對應之圖式省略記載為「1-44」。

【0064】 J2N-k倉鼠分成HMGB1胜肽(1-44)投予群(n=10)及PBS投予群(對照、n=10)，從第20週大(體重約120g)開始投予。待驗物質之投予係將以PBS作為溶劑，調整成1mg/ml之濃度的HMGB1胜肽(1-44)溶液以3ml/kg的量(胜肽之投予量為3mg/kg)，1日1次連續4日注入外頸靜脈而進行。對於對照群，將PBS以3ml/kg的量，1日1次連續4日注入外頸靜脈。投藥後第6週，於深度麻醉下施行開胸術，



摘取心臟。將心臟的中段(mid portion)分為冷凍保存用及石蠟固定用，實施病理組織學的檢查。又，使用心尖部的心肌進行分子生物學的研究，評價HMGB1胜肽(1-44)投予之效果。

## 【0065】 (2) 評價項目

### i) 心臟功能

投藥前、投藥後第4週及第6週實施心臟超音波，測定、計算左心室舒張末期徑(LVDd)、左心室收縮末期徑(LVDs)及左心室射出率(LVEF)，實施心臟功能評價。

### ii) 心肌之纖維化

將心肌組織切片以天狼星紅染色，算出染色陽性區佔心肌全體之面積的比例，定義為纖維化率(%)。

### iii) 血管新生

使用抗CD31抗體實施心肌組織切片的免疫染色，測定血管數(血管內皮細胞數)。此測定於不同的5個視野實施，並計算平均值。

### iv) 心肌細胞的肥大

實施心肌組織切片的PAS(Periodic Acid Schiff)染色，測定保持著核結構的心肌細胞的短徑並平均。此測定於不同的5個視野實施，計算平均值。

### v) 間葉系幹細胞的動員

使用針對間葉系幹細胞之表面標記的PDGFR $\alpha$ 及CD29之抗體，實施心肌組織切片的免疫染色，評價是否間葉系幹細胞有集中。細胞核的染色使用DAPI進行。

### vi) RT-PCR

使用心尖部的心肌，利用RT-PCR評價由間葉系骨髓幹細胞所分泌之血管新生因子VEGF、抗發炎細胞介素TSG-6之心肌內表現。

### vii) 粒腺體之結構

以電子顯微鏡觀察心肌細胞之結構。具體而言，將中段(mid-portion)的全層心肌作為樣本，利用1/2Karnovsky進行前固定、利用2%四氧化鐵酸進行後固定，利用0.5%乙酸鈷水溶液進行塊染色(block staining)，利用乙醇脫水後，使環氧樹脂(Quetol812)滲透並包埋、聚合，製作超薄切切片(70~110nm)，並利用乙酸鈷及鉛染色液實施電子染色後，以電子顯微鏡(H-7500、日立先端科技)觀察。

## 【0066】 (3) 結果

### i) 心臟功能

投藥4週後及6週後之心臟功能評價，與PBS群比較，HMGB1胜肽(1-44)群的LVEF為顯著高值，左心室收縮功能之下降受抑制(第1圖)。該結果顯示利用HMGB1胜肽(1-44)所獲致之心臟功能之改善效果。針對LVDd及LVDs，於投藥4週後及6週後的時點皆無顯著差異。

### ii) 心肌之纖維化

解析之結果，針對天狼星紅(sirius red)染色陽性區之比例，相較於PBS群，HMGB1胜肽(1-44)群顯著較小，顯示心肌的纖維化受抑制(第2圖)。

### iii) 血管新生

免疫染色之結果，在中層(mid layer)中，HMGB1胜肽(1-44)群相較於PBS群，血管數顯著較多，顯示血管新生亢進(第3圖)。在心內膜下層(subendocardial layer)，HMGB1胜肽(1-44)群相較於PBS群，有血管數較多的傾向。

### iv) 心肌細胞的肥大

PAS染色之結果，在心內膜下層(subendocardial layer)及中層(mid layer)，皆為HMGB1胜肽(1-44)群相較於PBS群，心肌細胞的短徑顯著較小，顯示心肌細胞的肥大化受抑制(第4圖)。

### v) 間葉系幹細胞之動員

免疫染色之結果，確認PDGFR $\alpha$ 及CD29兩者為陽性的細胞動員到HMGB1胜肽(1-44)群的心肌組織(第5圖)。又，HMGB1胜肽(1-44)群之心肌組織中，比起PBS群，顯著有較多PDGFR $\alpha$ 陽性且CD29陽性的細胞存在(第6圖)。

#### vi) RT-PCR

解析之結果，針對VEGF及TSG-6，任一皆為HMGB1胜肽(1-44)群相較於PBS群，表現量顯著較高(第7圖)。

#### vii) 粒腺體之結構

以電子顯微鏡觀察心肌細胞之結果，在PBS群觀察到粒腺體的皺褶結構消失，但在HMGB1胜肽(1-44)群皺褶結構維持(第8圖)。該結果支持藉由HMGB1胜肽(1-44)之投予獲致之心臟功能維持效果。

### 【0067】 實施例2

HMGB1胜肽片段對於擴張型心肌病之有效性之評價(長期觀察)

#### 【0068】 (1) 材料及方法

和實施例1同樣地準備20隻的J2N-k倉鼠，分成HMGB1胜肽(1-44)投予群(n=11)及PBS投予群(對照、n=9)，從第20週大開始投予。待驗物質之投予係將以PBS作為溶劑調整成1mg/ml之濃度的HMGB1胜肽(1-44)溶液以3ml/kg的量(胜肽之投予量為3mg/kg)，1日1次連續4日注入外頸靜脈以進行。在對照群，將PBS以3ml/kg的量，1日1次連續4日注入外頸靜脈。之後依通常之條件邊飼育邊繼續進行心臟功能及生存率的評價。

#### 【0069】 (2) 評價項目

##### i) 心臟功能

投藥前、投藥後第4週、及之後每2週實施心臟超音波，並量測LVEF。

##### ii) 生存率

最終投予後，依通常之條件繼續飼育並評價生存率。

**【0070】 (3) 結果**

## i) 心臟功能

HMGB1胜肽(1-44)群之LVEF，直到投予後6週，比起PBS群維持顯著高的值(第9圖)。

## ii) 生存率

長期觀察之結果，HMGB1胜肽(1-44)群有生存率較高的傾向(第10圖)。

**【0071】 實施例3**

HMGB1胜肽片段對於陳舊性心肌梗塞後之心臟功能改善之有效性之評價

**【0072】 (1) 材料及方法**

將SD大鼠(7週大、雄性、體重約250g)以吸入麻醉藥七氟烷(sevoflurane)(或異氟醚(isoflurane)麻醉，獲得充分的抑制狀態後，進行氣管內插管，並以吸入麻醉藥維持深麻醉。於仰臥位、左第4肋間開胸，將冠狀動脈左前降枝近位部以6-0 prolene縫合線結紮，作成廣範圍心肌梗塞模型。梗塞作成2週後以心臟超音波實施心臟功能評價，將獲得廣範圍梗塞的病例(LVEF < 50%)作為陳舊性心肌梗塞模型大鼠(共計17隻)。又，與上述實施例同樣，使用由序列編號：1形成的HMGB1胜肽(1-44)。

**【0073】** 將該陳舊性心肌梗塞模型大鼠分成HMGB1胜肽(1-44)投予群(n=9)及PBS投予群(對照、n=8)，自梗塞作成起2週後開始投予。待驗物質之投予係將以PBS作為溶劑調整成1mg/ml之濃度的HMGB1胜肽(1-44)溶液以3ml/kg的量(胜肽之投予量為3mg/kg)，1日1次連續4日注入大腿靜脈以進行。對於對照群，將PBS以3ml/kg的量，1日1次連續4日注入大腿靜脈。投藥後第4週，於深度麻醉下施行再開胸術，摘取心臟。摘出時從右心房朝向下大靜脈方向穿刺，收集血液5ml以上，將心臟梗塞範圍切分成厚度相等的4個短軸斷層，並分為冷凍保存用及石蠟固定用。將兩群使用心臟生理學的、病理組織學的、分子生物學的方

法比較探討，並評價HMGB1胜肽(1-44)投予之效果。又，模型大鼠之心肌梗塞發病後經2週(14日)以上的狀態，相當於人類之心肌梗塞發病後經30日以上之狀態。又，本次作成的陳舊性心肌梗塞模型大鼠，於投藥前的時點，LVEF低到42%，且對照群觀察到心臟擴大的進行，故可視為缺血性心肌病的模型。

#### 【0074】 (2) 評價項目

##### i) 心臟功能

於投藥後第1、2、及4週實施心臟超音波，測定、計算左心室舒張末期徑(LVDd)、左心室收縮末期徑(LVDs)及左心室射出率(LVEF)，實施心臟功能評價。

##### ii) 心肌之纖維化

將心肌組織切片以天狼星紅染色，算出染色陽性區佔左心室心肌全體之面積的比例，作為纖維化率(%)。

##### iii) 血管新生

在梗塞交界部實施von-Willbrand因子染色，測定血管數(血管內皮細胞數)。此測定於不同的10個視野實施，算出平均值。

##### iv) 心肌細胞的肥大

在梗塞交界部實施PAS(Periodic Acid Schiff)染色，測定梗塞交界部之保持核結構之心肌細胞的短徑並平均。此測定於不同的10個視野實施，並算出平均值。

##### v) 梗塞交界部之間葉系幹細胞之動員

使用針對間葉系幹細胞之表面標記之PDGFR $\alpha$ 、CD90、CD105的抗體實施心肌組織之免疫染色，評價是否在梗塞交界部有間葉系幹細胞之集中。細胞核之染色使用DAPI實施。

#### 【0075】 (3) 結果

##### i) 心臟功能

投藥4週後之心臟功能評價中，相較於PBS群，HMGB1胜肽(1-44)群的LVEF

為顯著較高值(第11圖)。又，針對投藥4週後之LVDd及LVDs，比起PBS群，HMGB1胜肽(1-44)群的值較小，可認為心臟擴大受抑制(第12圖)。

再者，關於LVEF之經時變化，PBS群在投藥後確認隨時間經過，LVEF減少，反觀HMGB1胜肽(1-44)群，直到投藥4週後觀測到隨時間經過，LVEF上昇，相對於投藥前平均有約7%的LVEF的改善(第13圖)。

#### ii) 心肌的纖維化

解析之結果，針對天狼星紅(sirius red)染色陽性區之比例，相較於PBS群，HMGB1胜肽(1-44)群為顯著較小，顯示心肌之纖維化受抑制(第14圖)。

#### iii) 血管新生

梗塞交界部之von-Willbrand因子染色之結果，HMGB1胜肽(1-44)群相較於PBS群，血管數顯著較多( $P=0.05$ )，顯示血管新生亢進(第15圖)。

#### iv) 心肌細胞之肥大

梗塞交界部之PAS染色之結果，HMGB1胜肽(1-44)群相較於PBS群，心肌細胞之短徑顯著較小( $P=0.05$ )，顯示心肌細胞之肥大化受抑制(第16圖)。

#### v) 梗塞交界部之間葉系幹細胞之動員

心肌組織之免疫染色之結果，認為PDGFR $\alpha$ 及CD90兩者皆為陽性之細胞及PDGFR $\alpha$ 及CD105兩方皆為陽性的細胞動員到HMGB1胜肽(1-44)群的梗塞交界部附近(第17及18圖)。又，HMGB1胜肽(1-44)群之梗塞交界部附近，相較於PBS群有較多PDGFR $\alpha$ 陽性且CD90陽性的細胞存在(第19圖)。

### 【0076】 實施例4

HMGB1胜肽片段對於高血壓性心肌病之有效性之評價

#### 【0077】 (1) 材料及方法

實驗使用為食鹽感受性的Dahl sensitive大鼠(以下也稱為DIS/Eis大鼠)。DIS/Eis大鼠若以高鹽分食物飼育則會成為高血壓，以高機率發生心臟衰竭之模

型(例如已確認出生後6週起以添加8%NaCl的飼料飼育時，則在出生後9週血壓會到達250mmHg，出生後12週起開始出現死亡例，到出生後16週為止以高機率死亡)。

準備10隻的DIS/Eis大鼠(6週大、雄、體重約200g、日本SLC)，分成高鹽分食物群(n=7)及低鹽分食物群(n=3)2群，前者供給添加8%NaCl的飼料、後者供給添加0.3%NaCl的飼料，繼續到15週大為止。食物以外不妨礙自由運動，籠內不限制飲水、攝食等，保持清潔、安靜地飼育。

11週大時，將高鹽分食物群(n=7)分成HMGB1胜肽(1-44)投予群(n=3)及對照群(n=4)，開始投予。待驗物質之投予係將以PBS作為溶劑調整成1mg/ml之濃度的HMGB1胜肽(1-44)溶液以3ml/kg的量(胜肽之投予量為3mg/kg)，1日1次連續4日注入尾靜脈以進行。對於對照群，將PBS以3ml/kg的量，1日1次連續4日注入尾靜脈。又，低鹽分食物群(n=3)也和對照群同樣連續4日間從尾靜脈投予PBS。投藥後第4週(15週大時)，於全身麻醉下實施開胸手術，摘出大鼠的心臟，實施心臟重量之測定後，於乳頭肌水平製作左心室心肌橫剖面的組織切片，實施組織學的解析。

又，以下將高鹽分食物給餌的HMGB1胜肽(1-44)投予群簡稱「High-1-44群」、高鹽分食物給餌的對照群簡稱「High-PBS群」、低鹽分食物群簡稱「Low-PBS群」。

## 【0078】 (2) 評價項目

### i) 心臟重量

15週大時從各群的大鼠摘出心臟並測定重量。

### ii) 心臟功能及心室的壁厚

投藥前、及投藥開始後每1週實施心臟超音波，測定、算出左心室舒張末期徑(LVDd)、左心室收縮末期徑(LVDs)、左心室射出率(LVEF)、擴張末期左心室

前壁厚(LVAWd)及擴張末期左心室後壁厚(LVPWd)。

iii) 心肌之纖維化

將心肌組織切片以天狼星紅染色，算出染色陽性區佔心臟全體或左心室之面積之比例，作為纖維化率(%)。

**【0079】 (3) 結果**

i) 心臟重量

相較於Low-PBS群，High-1-44群及High-PBS群的心臟重量較大。又，High-1-44群相較於High-PBS群，心臟重量較小，顯示由於HMGB1胜肽(1-44)的投予，心臟的肥大受抑制(第20圖)。

ii) 心臟功能

觀察期間中，LVEF在任一群皆維持在70%以上之值(群間沒有顯著差異)。

iii) 心室之壁厚

觀察期間內之LVAWd之變化示於第21圖。於15週大之時點，High-PBS群及High-1-44群之LVAWd比起Low-PBS群大，但High-1-44群之LVAWd比起High-PBS群小，觀察到由於HMGB1胜肽(1-44)之投予造成左心室前壁厚之增大受抑制之傾向。

iv) 心肌之纖維化

心肌組織切片之天狼星紅(sirius red)染色之結果示於第22圖。相較於Low-PBS群，確認High-PBS群在冠狀動脈周圍有纖維化之亢進。又，針對天狼星紅(sirius red)染色陽性區佔心臟全體之比例(纖維化率)，High-1-44群比起High-PBS群小，觀察到由於HMGB1胜肽(1-44)之投予造成心肌之纖維化有受抑制之傾向(第23圖A)。針對左心室之纖維化率，High-1-44群比High-PBS群小，顯示由於HMGB1胜肽(1-44)之投予造成心肌之纖維化受抑制(第23B圖)。

**【0080】 (4) 討論**



供給高鹽分食物的DIS/Eis大鼠，發生高血壓。又，確認該大鼠實際上發生心臟肥大及心肌細胞肥大。因此本實施例使用之供給高鹽分食物之DIS/Eis大鼠可評價為高血壓性心肌病之模型。

又，心臟肥大/心肌細胞肥大係帶來心臟之舒張功能之低落的結構異常。本實施例使用之供給高鹽分食物之DIS/Eis大鼠，維持正常的左心室收縮功能並發生心臟肥大/心肌細胞肥大，故也可評價作為HFpEF之模型。

本發明之HMGB1胜肽(1-44)，抑制在供給高鹽分食物之DIS/Eis大鼠之心臟肥大及心肌細胞肥大，故能夠用在預防及/或治療高血壓性心肌病及HFpEF。

#### [產業利用性]

**【0081】** 含有本申請案之胜肽之醫藥組合物，作為伴隨心臟之結構異常及/或功能障礙之心臟病症之預防及/或治療用之醫藥組合物為有用。又，含有本申請案之胜肽之醫藥組合物，期待能對於心肌病及陳舊性心肌梗塞及起因於此等的慢性心臟衰竭之患者、且由於高齡等原因而手術困難的患者、現有的慢性心臟衰竭治療藥物無法獲得充分效果的患者帶來重大好處。又，含有本申請案之胜肽之醫藥組合物，在擴張型心肌病、缺血性心肌病及高血壓性心肌病這些多數心肌病模型發揮心臟功能改善、心肌細胞肥大抑制等的效果，故期待對於包括原發性及繼發性之各種心肌病顯示廣泛地治療效果。

#### 【符號說明】

無。

## 【序列表】

- <110> 捷能密庫斯股份有限公司(Genomix Co., Ltd.)  
國立大學法人大阪大學(Osaka University)
- <120> 心肌病、陳舊性心肌梗塞及慢性心臟衰竭的治療藥物
- <130> G6-A1601-TW
- <150> JP 2017-013293  
<151> 2017-01-27
- <150> JP 2017-151788  
<151> 2017-08-04
- <160> 3
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1  
<211> 44  
<212> PRT  
<213> 人造序列
- <220>  
<223> 人工合成的胜肽序列
- <400> 1

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr  
1                   5                   10                   15

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro  
          20                   25                   30

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys  
          35                   40

- <210> 2  
<211> 215  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)
- <400> 2

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr  
 1 5 10 15

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro  
 20 25 30

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg  
 35 40 45

Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala  
 50 55 60

Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro  
 65 70 75 80

Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys  
 85 90 95

Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys  
 100 105 110

Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys  
 115 120 125

Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr  
 130 135 140

Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala  
 145 150 155 160

Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val  
 165 170 175

Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu  
 180 185 190

Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu

195

200

205

Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu  
 210 215

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 648

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 智人(Homo sapiens)

&lt;400&gt; 3

atgggcaaag gagatcctaa gaagccgaga ggcaaaatgt catcatatgc atttttgtg 60  
 caaacttgtc gggaggagca taagaagaag caccagatg cttcagtcaa cttctcagag 120  
 ttttctaaga agtgctcaga gaggtggaag accatgtctg ctaaagagaa aggaaaattt 180  
 gaagatatgg caaaagcggg caaggcccgt tatgaaagag aaatgaaaac ctatatccct 240  
 ccaaagggg agacaaaaaa gaagtcaag gatcccaatg cacccaagag gcctccttcg 300  
 gcctttctcc tcttctgctc tgagtatcgc caaaaaatca aaggagaaca tcctggcctg 360  
 tcattggtg atgttgcgaa gaaactggga gagatgtgga ataactgc tgcagatgac 420  
 aagcagcctt atgaaaagaa ggctgcgaag ctgaaggaaa aatacgaaaa ggatattgct 480  
 gcatatcgag ctaaaggaaa gcctgatgca gcaaaaaagg gagttgtcaa ggctgaaaaa 540  
 agcaagaaaa agaaggaaga ggaggaagat gaggaagatg aagaggatga ggaggaggag 600  
 gaagatgaag aagatgaaga tgaagaagaa gatgatgatg atgaataa 648

**【發明摘要】**

**【中文發明名稱】** 心肌病、陳舊性心肌梗塞及慢性心臟衰竭的治療藥物

**【中文】**

本案發明人等發現具有特定胺基酸序列之HMGB1胜肽片段在擴張型心肌病之動物模型顯示心臟功能的改善、心肌細胞肥大的抑制、心肌纖維化的抑制、及血管新生促進的效果，在起因於陳舊性心肌梗塞之缺血性心肌病之動物模型，該特定之HMGB1胜肽片段亦顯示心臟功能之改善、心臟擴大的抑制、心肌細胞肥大的抑制、心肌纖維化的抑制、及血管新生促進的效果，及在高血壓性心肌病之動物模型中，該特定之HMGB1胜肽片段顯示心肌細胞肥大的抑制及心肌纖維化的抑制效果。依據此等認識，提供一種心肌病及陳舊性心肌梗塞及由此等引起的慢性心臟衰竭的預防及/或治療用的醫藥組合物，其含有具特定之胺基酸序列之HMGB1胜肽片段。

**【指定代表圖】** 第2圖

**【代表圖之符號簡單說明】** 無

## 【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種預防及/或治療伴隨心臟之結構異常及/或功能障礙之心臟病症用之醫藥組合物，含有以下(a)至(c)中任一項所述之物質：

(a) 含有序列編號：1記載之胺基酸序列之HMGB1胜肽片段；

(b) 含有序列編號：1記載之胺基酸序列之1或多數個胺基酸經取代、缺失、插入或加成而得之胺基酸序列，且有刺激細胞遊走之活性之胜肽；及

(c) 含有與序列編號：1記載之胺基酸序列有約80%以上之序列相同度之胺基酸序列，且有刺激細胞遊走之活性之胜肽。

【第2項】 如申請專利範圍第1項所述之醫藥組合物，其中，伴隨心臟之結構異常及/或功能障礙之心臟病症為心肌病。

【第3項】 如申請專利範圍第2項所述之醫藥組合物，其中，心肌病為原發性心肌病。

【第4項】 如申請專利範圍第3項所述之醫藥組合物，其中，原發性心肌病係選自於由擴張型心肌病、肥大型心肌病、狹窄型心肌病及致心律失常型右室心肌病組成之群組。

【第5項】 如申請專利範圍第2項所述之醫藥組合物，其中，心肌病係繼發性心肌病。

【第6項】 如申請專利範圍第5項所述之醫藥組合物，其中，繼發性心肌病係選自於由缺血性心肌病、高血壓性心肌病、瓣膜症性心肌病、藥劑誘發性心肌病、酒精性心肌病、粒腺體心肌病、起因於心臟肉瘤病之心肌病、起因於心臟類澱粉變性病之心肌病、起因於心肌炎之心肌病、起因於肌肉萎縮症之心肌病、起因於心臟法布瑞氏症(Fabry disease)之心肌病及周產期心肌病組成之群組。

【第7項】 如申請專利範圍第1項所述之醫藥組合物，其中，伴隨心臟之結構異常及/或功能障礙之心臟病症為陳舊性心肌梗塞。

【第8項】 一種預防及/或治療起因於心肌病或陳舊性心肌梗塞之慢性心臟衰竭用之醫藥組合物，含有以下(a)至(c)中任一項所述之物質：

(a) 含有序列編號：1記載之胺基酸序列之HMGB1胜肽片段；

(b) 含有序列編號：1記載之胺基酸序列之1或多數個胺基酸經取代、缺失、插入或加成而得之胺基酸序列，且有刺激細胞遊走之活性之胜肽；及

(c) 含有與序列編號：1記載之胺基酸序列有約80%以上之序列相同度之胺基酸序列，且有刺激細胞遊走之活性之胜肽。

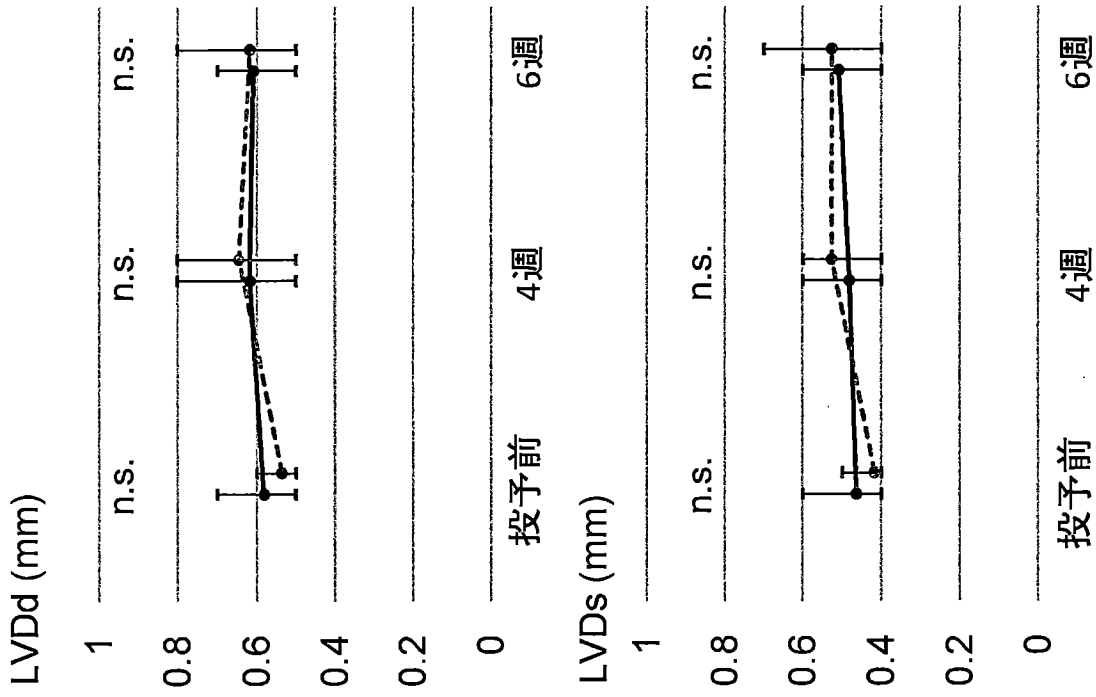
【第9項】 一種抑制在心肌病或陳舊性心肌梗塞之患者中之選自於由心臟擴大、心肌細胞肥大及心肌纖維化組成之群組中之心臟之結構異常用之醫藥組合物，含有下列(a)至(c)中任一項所述之物質：

(a) 含有序列編號：1記載之胺基酸序列之HMGB1胜肽片段；

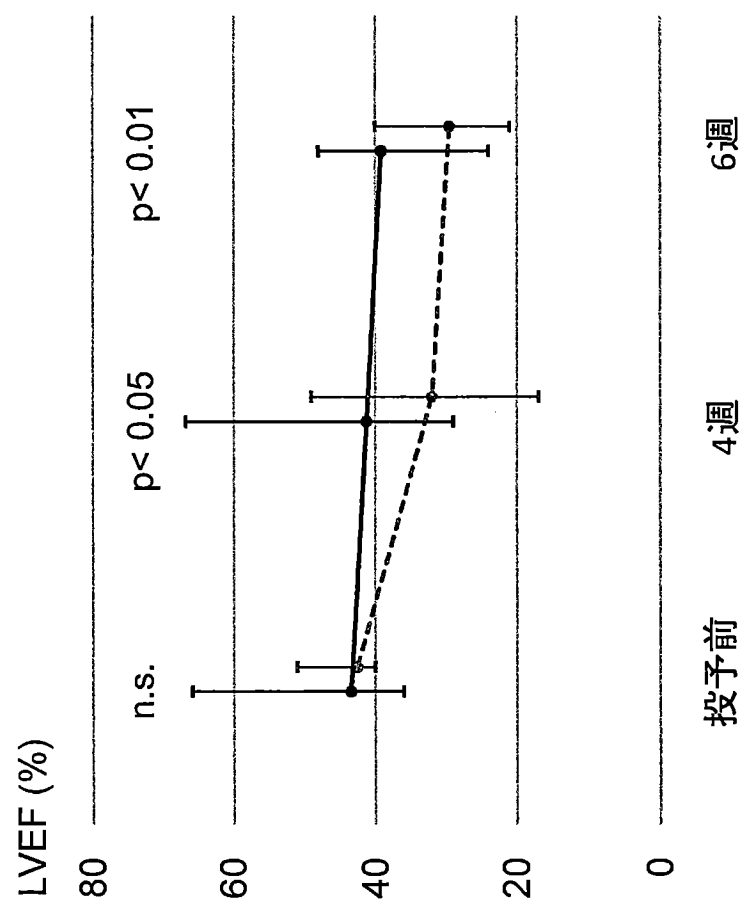
(b) 含有序列編號：1記載之胺基酸序列之1或多數個胺基酸經取代、缺失、插入或加成而得之胺基酸序列，且有刺激細胞遊走之活性之胜肽；及

(c) 含有與序列編號：1記載之胺基酸序列有約80%以上之序列相同度之胺基酸序列，且有刺激細胞遊走之活性之胜肽。

【發明圖式】



實線 : 1-44  
 虛線 : PBS



【第1圖】



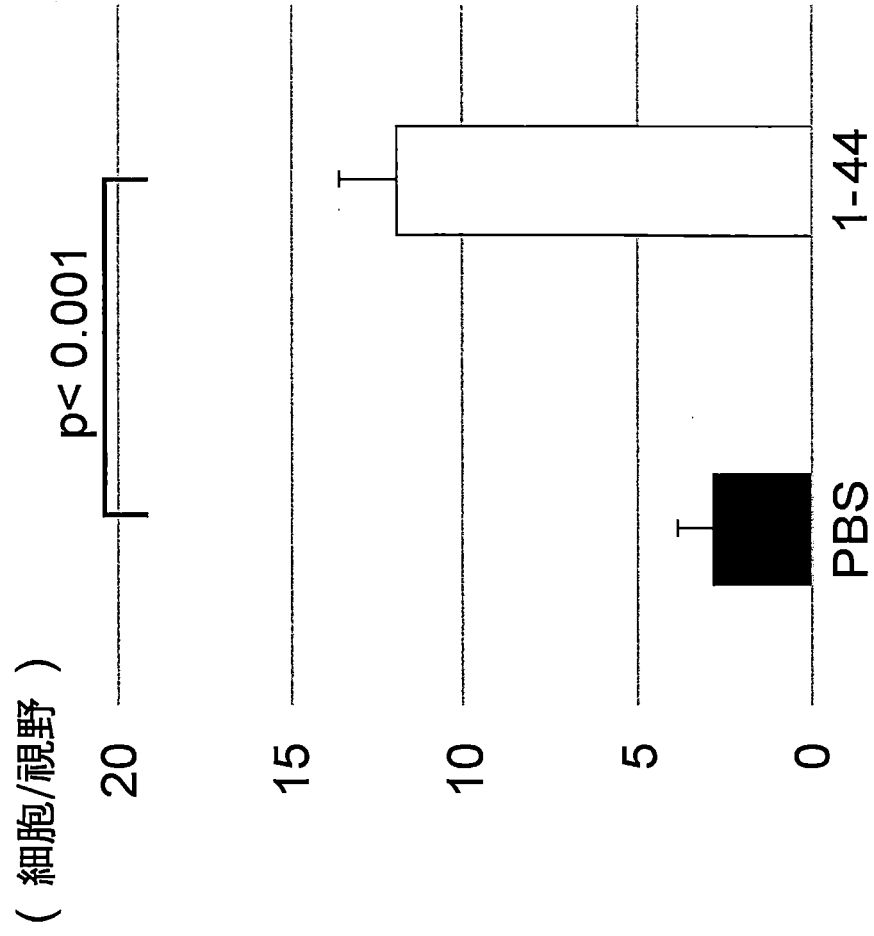






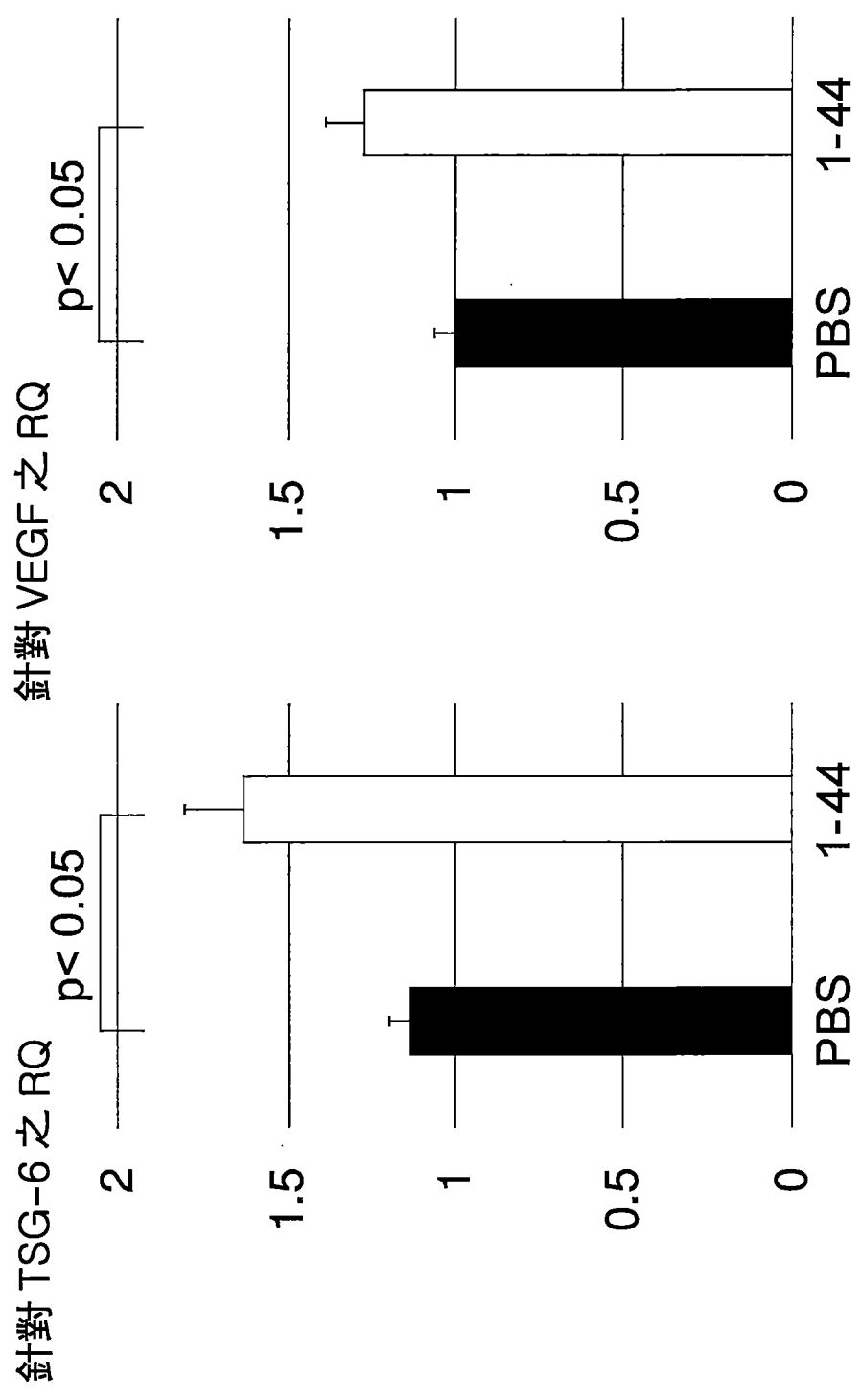


PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>CD29<sup>+</sup> 細胞



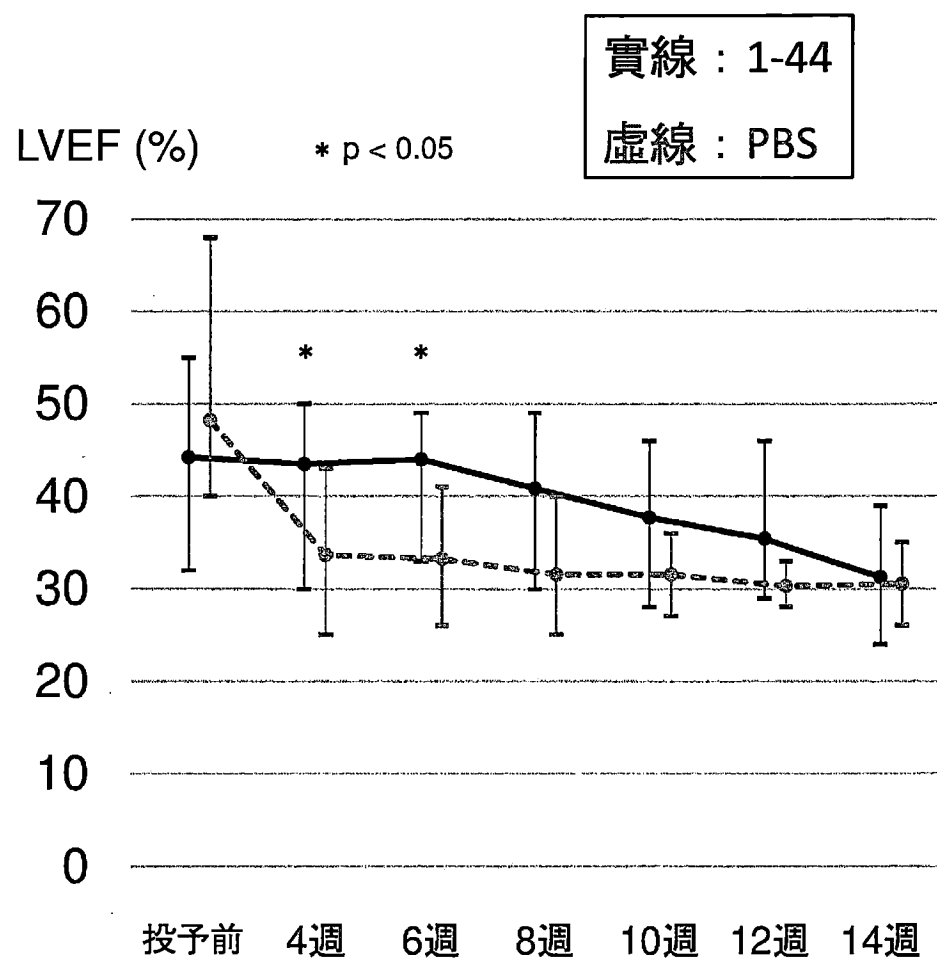
【第6圖】

# RT-PCR



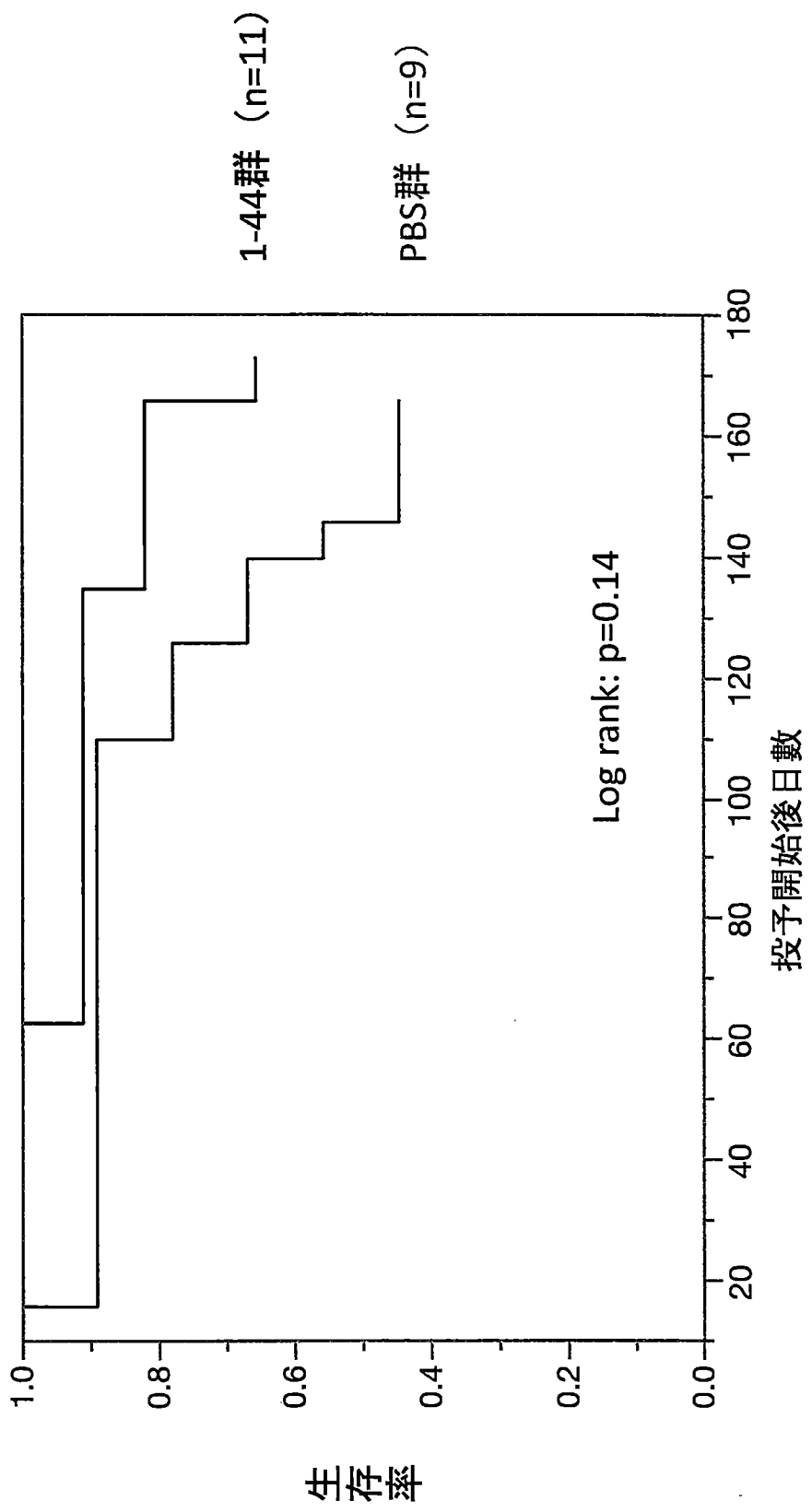
【第7圖】





【第9圖】





【第10圖】

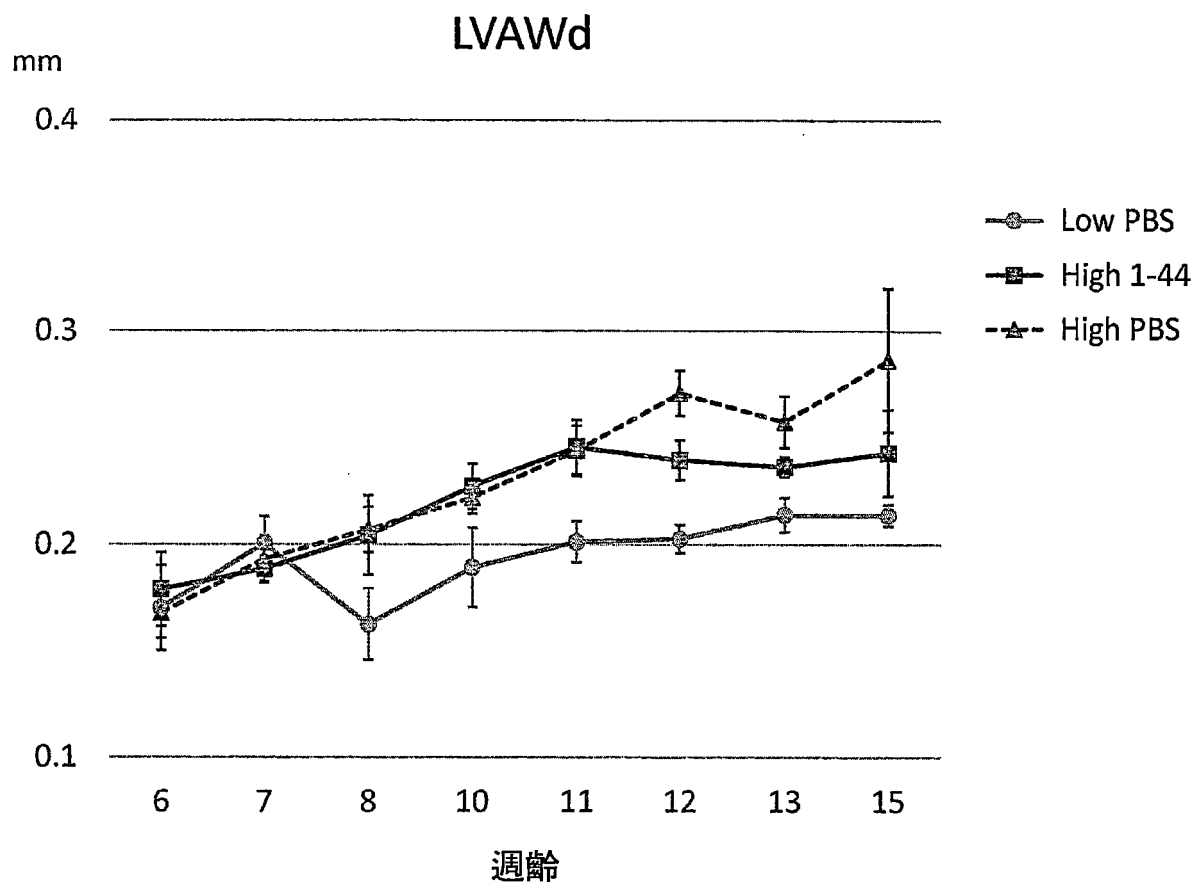












【第21圖】





