

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046026**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.01.31

(21) Номер заявки
202092458

(22) Дата подачи заявки
2019.04.11

(51) Int. Cl. **C07K 14/475** (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

**(54) КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО СЛИТОГО БЕЛКА,
СОДЕРЖАЩЕГО НЕЙРЕГУЛИН-1 (NRG-1) ЧЕЛОВЕКА, И СПОСОБЫ ИХ
ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 62/656,246

(32) 2018.04.11

(33) US

(43) 2021.02.08

(86) PCT/US2019/026889

(87) WO 2019/200033 2019.10.17

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**САЛЮБРИС БАЙОТЕРАПЬЮТИКС,
ИНК. (US); САЛЮБРИС (ЧЭНДУ)
БАЙОТЕК КО., ЛТД. (CN)**

(72) Изобретатель:
**Ли Джон (US), Ли Шэнвэй, Ло Дисян,
У Ижань, Чжоу Мин (CN), Чжуан
Сяолэй (US), Хуа Лян, Ло Пэни, Ван
Ян (CN)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) EP-A1-0586607
WO-A2-2006017184
US-A1-2007081992
WO-A1-2007062594
ANDREW JABBOUR ET AL.: "Parenteral administration of recombinant human neuregulin-1 to patients with stable chronic heart failure produces favourable acute and chronic haemodynamic responses", EUROPEAN JOURNAL OF HEART FAILURE, vol. 13, no. 1, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 83-92, XP055599027, NL ISSN: 1388-9842, DOI: 10.1093/eurjhf/hfq152 abstract EP-A1-2555788

WO-A1-2015155998
NICO JACOBI ET AL.: "ErbB Family Signalling: A Paradigm for Oncogene Addiction and Personalized Oncology", CANCERS, vol. 9, no. 12, 12 April 2017 (2017-04-12), page 33, XP055599065, DOI: 10.3390/cancers9040033 abstract

(57) Изобретение относится к рекомбинантному слитому белку, содержащему фрагмент кардиопротективного белка нейрегулина-1 (NRG-1), слитый с каркасом моноклонального антитела (mAb), и способу лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение терапевтически эффективного количества указанного рекомбинантного слитого белка или фармацевтической композиции, содержащей указанный рекомбинантный слитый белок, описанный в изобретении.

B1

046026

**046026
B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Изобретение испрашивает приоритет и преимущество согласно предварительной заявке на патент США № 62/656 246, поданной 11 апреля 2018 года, содержание которой полностью включено в настоящее изобретение посредством ссылки.

Включение посредством ссылки перечня последовательностей

Настоящее изобретение содержит "Перечень последовательностей", который был подан в формате ASCII через систему EFS-Web и, таким образом, полностью включен в настоящее изобретение посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 16 марта 2019 года, называется SBTI-001-001WO_SeqList.txt и имеет размер 31,328 байт.

Уровень техники

Нейрегулин (NRG; херегулин, HRG), также известный как глиальный фактор роста (glial growth factor, GGF) и новый фактор дифференцировки (new differentiation factor, NDF), представляет собой тип гликопротеина, молекулярная масса которого составляет 44 кДа. Семейство белков NRG включает четыре представителя: NRG-1, NRG-2, NRG-3 и NRG-4. NRG (включая NRG-1) играет особо важную роль в развитии сердца. Являясь лигандом тирозинкиназных рецепторов семейства ErbB, NRG-1 непосредственно связывается с мембраносвязанным ErbB3 или ErbB4, вызывая их димеризацию с образованием комплексов ErbB2/ErbB4, ErbB2/ErbB3, ErbB3/ErbB3 и ErbB4/ErbB4 и последующий внутриклеточный сигналинг. На животных моделях экспрессия NRG вызывает паракринный сигналинг, стимулирующий рост и дифференцировку клеток ткани сердца во время эмбриогенеза, при этом удаление любого из ErbB2, ErbB4 или NRG-1 приводит к летальности в эмбриональном периоде. Более того, было показано, что противораковая терапия, приводящая к блокировке сигналинга рецептора ErbB2, вызывает значительные кардиотоксические побочные эффекты, показывая, что у людей ErbB2-опосредованный сигналинг является существенно важным не только для развития, но и для гомеостаза здоровой ткани сердца.

Данные показывают, что передача сигнала NRG-1 играет роль в развитии и функционировании других систем органов, а также в патогенезе заболеваний человека (включая шизофрению и рак головы и шеи). NRG-1 имеет много изомеров. Исследования на мышах, имеющих генные мутации (нокауты генов), указывают на то, что изомеры с различными N-концевыми участками или EGF-подобными доменами имеют разные функции *in vivo*. Настоящее изобретение основано на изоформе NRG-1βa2.

Эндогенный NRG-1 связывается и вызывает сигналинг как через ErbB3 (HER3), так и через ErbB4 (HER4). Множество доклинических и клинических исследований показало терапевтический потенциал NRG-1 в отношении различных сердечно-сосудистых симптомов, обусловленный главным образом его взаимодействием с экспрессируемым кардиомиоцитами ErbB4 (HER4). Однако три ключевых фактора ограничивают клиническое применение и целесообразность использования рекомбинантного человеческого NRG-1 (rhNRG-1). Во-первых, сигналинг NRG-1 через HER3 может стимулировать развитие и/или прогрессирование рака, вызывая значительные опасения при любом применении NRG-1, требующем длительного приема, а также при применении в отсутствие серьезного сердечно-сосудистого (СС) риска. Во-вторых, опосредованная NRG-1 гиперактивация HER3 может вызывать нарушение целостности эпителия желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и его гомеостаза, приводя к острой связанной с ЖКТ токсичности и, таким образом, упущению терапевтического окна для NRG-1. В-третьих, оба активных белковых фрагмента rhNRG-1, находящихся на клинической стадии исследований, показали короткий период полувыведения, что указывает на возможную необходимость применения тяжело переносимых доз и режимов введения для достижения желаемого терапевтического уровня воздействия. В связи с этим существует необходимость в обеспечении терапевтического средства на основе NRG-1, которое сохраняет клинически значимый терапевтический потенциал в отношении различных сердечно-сосудистых симптомов и обладает при этом сниженным риском стимуляции онкогенеза или прогрессирования рака, лучшей переносимостью со стороны ЖКТ и более благоприятным фармакокинетическим (ФК) профилем.

Настоящее изобретение решает указанные проблемы путем обеспечения рекомбинантного белка, содержащего активный домен rhNRG-1, слитый с HER3-специфичным антителом-антагонистом: сигналинг HER3 блокируется таким образом, что снижается риск онкогенности и токсичности rhNRG-1 в отношении ЖКТ, в то же время каркас антитела предоставляет типичный для моноклонального антитела период полувыведения молекулы, обеспечивая более удобное дозирование и введение продукта.

Краткое описание изобретения

Согласно одному аспекту, настоящее изобретение относится к рекомбинантному слитому белку, содержащему фрагмент кардиопротективного белка нейрегулина-1 (NRG-1), слитый с каркасом моноклонального антитела (monoclonal antibody, mAb). Согласно связанному аспекту, фрагмент NRG-1 слит с C-концом тяжелой цепи антитела через линкер. Согласно другому связанному аспекту, NRG-1 присоединен к линкеру через первую (1-ую) аминокислоту на N-конце NRG-1, представляющую собой аминокислоту серин (S или Ser), согласно одному варианту реализации изобретения. Согласно связанному аспекту, фрагмент представляет собой активный фрагмент, который содержит активный домен NRG-1. Согласно другому связанному аспекту, mAb является моноспецифичным в отношении ErbB3 (HER3). Согласно другому связанному аспекту, NRG-1 представляет собой изоформу NRG-1β2a.

Согласно другому аспекту, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантный слитый белок, который содержит фрагмент кардиопротективного белка нейрегулина-1 (NRG-1), слитый с каркасом моноклонального антитела против HER3, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

Согласно другому аспекту, изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного слитого белка или фармацевтической композиции, содержащей указанный рекомбинантный слитый белок, описанный в настоящем изобретении.

Согласно другому аспекту, изобретение относится к способу предотвращения, ингибирования, подавления или задержки начала развития сердечнососудистого заболевания или состояния у субъекта, включающему введение эффективного количества рекомбинантного слитого белка, описанного в настоящем изобретении.

Согласно другому аспекту, изобретение относится к способу лечения связанного с ЦНС заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного слитого белка.

Согласно другому аспекту, изобретение относится к способу предотвращения, ингибирования, подавления или задержки начала развития связанного с ЦНС заболевания или состояния у субъекта, включающему введение эффективного количества рекомбинантного слитого белка.

Согласно другому связанному аспекту, NRG-1 связывается и вызывает сигналинг через ErbB4 (HER4). Согласно другому связанному аспекту, mAb ингибирует сигналинг NRG-1 через ErbB3 (HER3).

Согласно другому аспекту, изобретение относится к набору, содержащему эффективное количество рекомбинантного слитого белка согласно изобретению или фармацевтической композиции, содержащей указанный рекомбинантный слитый белок согласно изобретению.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из следующего далее подробного описания примеров и графических материалов. Однако следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, показывающие варианты реализации настоящего изобретения, приведены исключительно в качестве иллюстрации, поскольку из подробного описания изобретения специалистам в данной области техники будут очевидны различные возможные изменения и модификации в пределах сущности и объема настоящего изобретения.

Краткое описание чертежей

Получить более полное понимание настоящего изобретения, а также увидеть и с легкостью оценить различные цели и преимущества настоящего изобретения можно со ссылкой на следующее далее подробное описание и прилагаемую формулу изобретения при их рассмотрении вместе с сопутствующими графическими материалами, где:

на фиг. 1 показано конструирование экспрессионных плазмид для экспрессии рекомбинантного слитого белка, описанного в настоящем изобретении.

На фиг. 2A-D схематично показана структура рекомбинантного слитого белка, описанного в настоящем изобретении. На фиг. 2A схематично показана молекулярная структура слитого белка mAb против Her3/NRG-1 согласно изобретению. На фиг. 2B показаны репрезентативные данные, полученные в результате анализа с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза. На фиг. 2C показаны результаты анализа с помощью Вестерн-блоттинга с выявлением с помощью первичных антител, специфичных в отношении активного фрагмента NRG-1, состоящего из 61 аминокислоты и содержащего HER3/4-связывающий домен ("NRG-1", R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота). На фиг. 2D показаны результаты анализа с помощью Вестерн-блоттинга с выявлением с помощью первичных антител, специфичных в отношении IgG.

Фиг. 3 иллюстрирует анализ связывания, показывающий, что рекомбинантный слитый белок, описанный в настоящем изобретении, связывается с белком HER3 (кривая 1, этап 2) и может одновременно связываться с антителом против NRG-1 (кривая 1, этап 3). Следует отметить, что в рекомбинантный слитый белок, описанный в настоящем изобретении, вводили мутации Fc для подавления эффекторной функции Fc исходной последовательности антитела, кодирующей HER3-специфичное антитело, где указанные мутации могут приводить к снижению нежелательной цитотоксичности в отношении нормальных тканей, экспрессирующих рецептор HER3.

На фиг. 4A-D представлены репрезентативные графики, показывающие среднюю относительную скорость роста \pm стандартная ошибка среднего, SEM (n=3), для различных раковых клеточных линий, обработанных слитым белком mAb против Her3/NRG-1 или контрольными агентами. На фиг. 4A показана средняя относительная скорость роста клеточной линии рака желудка NCI-N87. На фиг. 4B показана средняя относительная скорость роста клеточной линии рака молочной железы MCF-7. На фиг. 4C показана средняя относительная скорость роста клеточной линии рака мочевого пузыря RT-112. На фиг. 4D показана средняя относительная скорость роста клеточной линии рака молочной железы T47D. Рекомбинантный слитый белок, предложенный в настоящем изобретении, демонстрирует значительно более низкую активность в стимуляции пролиферации раковых клеток по сравнению с пептидом NRG-1 и слитым белком mAb GP120/NRG-1, используемыми в качестве контроля.

Фиг. 5А, В иллюстрируют, что, несмотря на сниженный потенциал в стимуляции роста раковых клеток, рекомбинантный слитый белок, предложенный в настоящем изобретении, полностью сохраняет способность индуцировать сигналинг PI3K/АКТ в кардиомиоцитах, демонстрируя активность, сравнимую с рекомбинантным NRG-1 и белком слияния mAb GP120/NRG-1. Фиг. 5А представляет собой график, показывающий отношение фосфо-АКТ (pАКТ) к общему АКТ (tАКТ) в зависимости от концентрации антитела (в нМ) в кардиомиоцитах человека, получавшего лечение рекомбинантным белком слияния согласно изобретению и контролями. Фиг. 5В представляет собой результаты анализа фосфорилирования АКТ с помощью Вестерн-блоттинга в кардиомиоцитах человека, получавшего лечение рекомбинантным белком слияния согласно изобретению и контролями.

На фиг. 6А-С показано прямое сравнение димеризации HER2/4 и HER2/3 в присутствии рекомбинантного слитого белка, описанного в настоящем изобретении, и контролей. На фиг. 6А показан принцип анализа для выявления вызванной лигандом димеризации. Анализ димеризации PathHunter, разработанный компанией Eurofins DiscoverX (Фримонт, Калифорния) используется для выявления вызванной лигандом димеризации двух субъединиц пары рецептор-димер. Фермент β -gal расщеплен на два фрагмента, ProLink (PK) и рецептор фермента (EA). Были сконструированы клетки для коэкспрессии белка-мишени 1, слитого с донором фермента PK, и белка-мишени 2, слитого с акцептором фермента EA. Связывание лиганда с одним белком-мишенью вызывает его взаимодействие с другим белком-мишенью, стимулируя комплементарное связывание двух фрагментов фермента и приводя к ферментативной реакции с высвобождением хемилюминесцентного сигнала, который выявляется как относительные единицы флуоресценции, или ОЕФ. Фиг. 6В представляет собой график, иллюстрирующий, что рекомбинантный слитый белок, предложенный в настоящем изобретении, может вызывать димеризацию HER2/HER4 с активностью, сравнимой с NRG-1. Фиг. 6С представляет собой график, иллюстрирующий, что рекомбинантный слитый белок, предложенный в настоящем изобретении, значительно менее активен по сравнению с NRG-1 в стимулировании димеризации HER2/HER3. Указанные наблюдения дополнительно подтверждают, что рекомбинантный слитый белок, предложенный в настоящем изобретении, сохраняет полноценный потенциал в стимуляции сигналинга HER2/4 NRG-1 при значительном снижении стимуляции сигналинга HER2/3.

Фиг. 7 иллюстрирует аффинность связывания слитого белка mAb против Her3/NRG-1 согласно изобретению с антигеном HER3 для различных видов, включая человека, обезьяну, крысу и мышь. Равновесная константа диссоциации (KD), определенная с помощью анализа BIAcore, составляет $3,13 \times 10^{-10}$ (человек), $3,97 \times 10^{-10}$ (обезьяна), $2,68 \times 10^{-9}$ (крыса) и $2,77 \times 10^{-9}$ (мышь) соответственно. Эти данные указывают, что рекомбинантный слитый белок согласно изобретению имеет сходную аффинность связывания с человеческим и обезьяньим HER3, тогда как его аффинность в отношении HER3 грызунов (крысы и мыши) ниже примерно на один порядок величины.

Фиг. 8 представляет собой график, иллюстрирующий эффект рекомбинантного слитого белка на фракцию выброса (EF) на крысиной модели систолической сердечной недостаточности, вызванной перевязкой коронарной артерии.

Фиг. 9А-Ф представляют собой ряд из 6 изображений, показывающих гистопатологические изменения в структуре сердечной мышцы на крысиной модели систолической сердечной недостаточности, вызванной перевязкой коронарной артерии. Сердечные ткани, прилежащие к области хирургического вмешательства, собирали и фиксировали в 4% формальдегиде, затем готовили парафиновые срезы и окрашивали с помощью гематоксилина-эозина (H&E). На фиг. 9А показана сердечная ткань от ложноперитонизированной контрольной крысы. На фиг. 9В показана сердечная ткань от крысы модели систолической сердечной недостаточности, получавшей лечение контролем, представляющим собой носитель. На фиг. 9С показано сердечная ткань от крысы модели систолической сердечной недостаточности, получавшей лечение mAb GP120/NRG-1 (10 мг/кг). На фиг. 9D показана сердечная ткань от крысы модели систолической сердечной недостаточности, получавшей лечение mAb против Her3/NRG-1 (1 мг/кг). На фиг. 9Е показана сердечная ткань от крысы модели систолической сердечной недостаточности, получавшей лечение mAb против Her3/NRG-1 (3 мг/кг). На фиг. 9F показана сердечная ткань от крысы модели систолической сердечной недостаточности, получавшей лечение mAb против Her3/NRG-1 (10 мг/кг).

Фиг. 10 представляет собой график, иллюстрирующий оценку *in vivo* противоопухолевой активности с использованием модели подкожного ксенотрансплантата карциномы FaDu на мышах NOD/SCID.

Фиг. 11 представляет собой график, иллюстрирующий изменения массы тела у имеющихся опухоли мышей, получавших лечение рекомбинантным белком слияния согласно изобретению и контролями.

Фиг. 12 представляет собой график, иллюстрирующий фармакокинетический профиль рекомбинантного слитого белка у макаков-крабоедов (яванских макаков).

Подробное описание

Согласно настоящему изобретению, рекомбинантный слитый белок, содержащий моноклональное антитело, слитое с активным фрагментом изоформы белка нейрегулина 1, применяется для лечения различных сердечно-сосудистых симптомов и заболеваний центральной нервной системы (ЦНС).

Определения.

Если иное не указано, технические и научные термины, используемые в настоящем изобретении, имеют такое же значение, которое обычно понимается специалистами в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение.

В целях интерпретации настоящего изобретения будут использоваться следующие далее определения. Во всех случаях подходящие термины, используемые в единственном числе, также включают множественное число, и наоборот. В случае, когда любое определение, изложенное ниже, противоречит какому-либо документу, включенному в настоящее изобретение посредством ссылки, определение, изложенное ниже, будет иметь преимущественную силу.

"Нейрегулин или аналоги нейрегулина" представляют собой молекулы, которые могут активировать гетеродимерные протеин-тирозинкиназы ErbB2/ErbB4 или ErbB2/ErbB3, такие как все изоформы нейрегулина, отдельный EGF-домен нейрегулина, мутанты нейрегулина и любой тип нейрегулин-подобных генных продуктов, которые также активируют указанные выше рецепторы. Предпочтительный "нейрегулин", применяемый согласно настоящему изобретению, представляет собой полипептидный фрагмент человеческого нейрегулина 1 изоформы $\beta 2$, содержащий EGF-подобный домен и рецептор-связывающий домен. Согласно одному варианту реализации изобретения, фрагмент нейрегулина представляет собой активный фрагмент. Нейрегулин-1 (NRG-1) и его изоформы также известны в данной области техники как нейрегулин 1 (NRG1), глиальный фактор роста (GGF), херегулин (HGL), HRG, новый фактор дифференцировки (NDF), ARIA, GGF2, HRG1, HRGA, SMDF, MST131, MSTP131 и интронный транскрипт NRG1 2 (NRG1-IT2).

Термины "ErbB3", "ErbB3 (HER3)", "HER3" относятся к одному и тому же белку (или одному и тому же гену при ссылке на ген) и используются взаимозаменяемо в настоящем изобретении. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, рекомбинантный слитый белок содержит часть моноклонального антитела, которая специфична в отношении ErbB3. ErbB3 (erb-b2 рецепторная тирозинкиназа 3) также известна в данной области техники как FERLK, LCCS2, ErbB-3, c-ErbB3, erbB3-S, MDA-BF-1, c-erbB-3, p180-ErbB3, p45-sErbB3 и p85-sErbB3.

Согласно одному варианту реализации изобретения, термины "ErbB4", "ErbB4 (HER4)", "HER4" относятся к одному и тому же белку (или одному и тому же гену при ссылке на ген) и используются взаимозаменяемо в настоящем изобретении. ErbB4 (erb-b2 рецепторная тирозинкиназа 4) также известна в данной области техники как ALS19 и p180ErbB4.

Согласно одному варианту реализации изобретения, термины "ErbB2", "ErbB2 (HER2)", "HER2" относятся к одному и тому же белку (или одному и тому же гену при ссылке на ген) и используются взаимозаменяемо в настоящем изобретении. ErbB2 (erb-b2 рецепторная тирозинкиназа 2) также известна в данной области техники как NEU, NGL, TKR1, CD340, HER-2, MLN 19 и HER-2/neu.

Термин "активный" при использовании в настоящем изобретении, относится к фрагменту, обладающему биологической активностью или биологической функцией. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, активность равна или приближена к активности белка дикого типа.

Термин "субъект" при использовании в настоящем изобретении включает, но не ограничивается указанными, млекопитающее, включая, например, человека, не представляющего собой человека примата (например, обезьяну), мышшь, свинью, корову, козу, кролика, крысу, морскую свинку, хомяка, лошадь, обезьяну, овцу или другое млекопитающее, не представляющее собой человека; не млекопитающее, включая, например, позвоночное, не представляющее собой млекопитающее, такое как птица (например, курица или утка) или рыба; и не представляющее собой млекопитающее беспозвоночное. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, способы и композиции согласно изобретению применяются для лечения (профилактического и/или терапевтического) животных, не представляющих собой человека. Термин "субъект" также может относиться к пациентам, т.е. индивидам, ожидающим или получающим медицинскую помощь.

Термин "фармацевтические композиции" в настоящем изобретении означает композицию, подходящую для фармацевтического применения у субъекта, включая животное или человека. Фармацевтические композиции в целом содержат эффективное количество активного агента (например, рекомбинантных слитых белков согласно изобретению) и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество (например, буфер, адъювант и т.п.).

Термин "эффективное количество" означает дозу или количество, достаточное для получения желаемого результата. Желаемый результат может включать объективное или субъективное улучшение у реципиента указанной дозы или количества (например, длительная выживаемость, снижение количества и/или размера опухолей, эффективное предотвращение заболевания и т.д.).

"Профилактическое лечение" представляет собой лечение, проводимое субъекту, который не проявляет признаков или симптомов заболевания, патологии или медицинского расстройства или проявляет только ранние признаки или симптомы заболевания, патологии или расстройства, таким образом, что лечение проводят в целях ослабления, предотвращения или снижения риска развития указанного заболевания, патологии или медицинского расстройства. Профилактическое лечение действует как превентивное лечение указанного заболевания или расстройства. "Профилактическая активность" представляет

собой активность агента, такого как рекомбинантный слитый белок согласно изобретению, или содержащей его композиции, которая при введении субъекту, не проявляющему признаков или симптомов патологии, заболевания или расстройства (или который проявляет только ранние признаки или симптомы патологии, заболевания или расстройства) облегчает, предотвращает или снижает риск развития указанной патологии, заболевания или расстройства у указанного субъекта. "Профилактически применимый" агент или соединение (например, рекомбинантный слитый белок согласно изобретению) относится к агенту или соединению, которое применимо для облегчения, предотвращения, лечения или снижения риска развития патологии, заболевания или расстройства.

"Терапевтическое лечение" представляет собой лечение, проводимое субъекту, у которого проявляются симптомы или признаки патологии, заболевания или расстройства, при котором указанное лечение проводят для снижения или устранения у указанного субъекта признаков или симптомов патологии, заболевания или расстройства. "Терапевтическая активность" представляет собой активность агента, такого как рекомбинантный слитый белок согласно изобретению, или содержащей его композиции, которая приводит к устранению или снижению признаков или симптомов патологии, заболевания или расстройства при введении субъекту, страдающему такими признаками или симптомами. "Терапевтически применимый" агент или соединение (например, рекомбинантный слитый белок согласно изобретению) означает, что указанный агент или соединение применимо для снижения, лечения или устранения таких признаков или симптомов патологии, заболевания или расстройства.

Термин "лечение рака" при использовании в настоящем изобретении, если иное не указано, означает обращение, облегчение, подавление прогрессирующего или предотвращение частично или полностью роста опухолей, опухолевых метастазов или других вызывающих рак клеток или неопластических клеток у субъекта. Термин "лечение" при использовании в настоящем изобретении, если иное не указано, относится к акту лечения.

Термин "лечение сердечно-сосудистого заболевания" при использовании в настоящем изобретении, если иное не указано, означает предотвращение, ингибирование, подавление, задержку, обращение или облегчение частично или полностью начала развития сердечно-сосудистого заболевания или состояния у субъекта или прогрессирующего предсуществующего сердечно-сосудистого заболевания или состояния или его симптома у субъекта. Неограничивающие примеры сердечно-сосудистых заболеваний, которые можно лечить с помощью способов согласно изобретению, включают хроническую сердечную недостаточность/застойную сердечную недостаточность (ЗСН), острую сердечную недостаточность/инфаркт миокарда (ИМ), систолическую дисфункцию левого желудочка, реперфузионное повреждение, связанное с ИМ, вызванную химиотерапией кардиотоксичность (у взрослого или ребенка), вызванную радиацией кардиотоксичность, а также лечение в дополнение к хирургическому вмешательству при врожденном заболевании сердца у детей. Неограничивающие примеры симптомов сердечнососудистого заболевания включают затрудненное дыхание, кашель, быстрый набор веса, опухание ног, голеностопов и брюшной полости, головокружение, утомляемость, слабость, вертиго, боль в грудной клетке, обморок (синкопу), тахикардию и брадикардию. Способы определения прогрессирующего сердечно-сосудистого заболевания и эффективности лечения будут легко понятны специалисту в данной области техники. Например, прогрессирующее различных сердечно-сосудистых заболеваний можно определить на основе фракции выброса, электрокардиограммы (ЭКГ), холтеровского мониторирования, эхокардиограммы, стресс-теста, коронарографии, сканирования сердца с помощью компьютерной томографии (КТ) и визуализации сердца с помощью магнитного резонанса (МРТ).

Термин "лечение связанного с центральной нервной системой (ЦНС) заболевания" при использовании в настоящем изобретении, если иное не указано, означает способ предотвращения, ингибирования, подавления, задержки, обращения или облегчения частично или полностью начала развития связанного с ЦНС заболевания или состояния у субъекта. Термин "лечение связанного с ЦНС заболевания" также может означать обращение, замедление или облегчение другим образом предсуществующего связанного с ЦНС заболевания или состояния или его симптома. Неограничивающие примеры связанных с ЦНС заболеваний или состояний, которые можно лечить с помощью способов согласно изобретению, включают амиотрофический боковой склероз (АБС), болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, паралич Белла, эпилепсию и эпилептические припадки, синдром Гийена-Барре, инсульт, травматическое повреждение мозга, множественный склероз или их комбинацию. Лечение связанных с ЦНС заболеваний может улучшать или предотвращать симптомы, такие как тремор, радикинезия, жесткость мышц, потеря равновесия, нарушение осанки, изменения речи, потеря двигательного контроля, паралич, затрудненное глотание, мышечные судороги, эпилептические припадки, потеря памяти и спутанность сознания.

Термины "идентичный" или "процентная идентичность" в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов относятся к двум или более последовательностям или субпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют точно определенный процент нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми при сравнении и выравнивании для максимального соответствия. Для определения процентной идентичности последовательности выравнивают для оптимального сравнения (например, можно вводить пропуски в первую последовательность аминокислот или нуклеиновых кислот для оптимального выравнивания со второй последователь-

ностью аминокислот или нуклеиновых кислот). Затем проводят сравнение аминокислотных остатков или нуклеотидов в соответствующих положениях аминокислот или нуклеотидов. Когда положение первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, тогда молекулы являются идентичными в указанном положении. Процентная идентичность между двумя последовательностями представляет собой функцию числа положений, идентичных для обеих последовательностей (т.е. % идентичности = # идентичных положений/общее # положений (например, перекрывающиеся положения)×100). Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, две последовательности имеют одинаковую длину.

Термин "по существу идентичные" в контексте двух нуклеиновых кислот или полипептидов относится к двум или более последовательностям или субпоследовательностям, которые идентичны по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% (например, как определено с использованием одного из способов, изложенных ниже).

При использовании в настоящем изобретении термин "связывается", "специфично связывается" или является "специфичным в отношении" относится к измеримым и воспроизводимым взаимодействиям, таким как связывание между мишенью и антителом, которое определяет наличие мишени в присутствии гетерогенной популяции молекул, включая биологические молекулы. Например, антитело, которое специфично связывается с мишенью (которая может представлять собой эпитоп) представляет собой антитело, которое связывается с указанной мишенью с более высокой аффинностью, авидностью, более легко и/или с большей продолжительностью по сравнению с его связыванием с другими мишенями. Согласно одному варианту реализации изобретения, степень связывания антитела с несоответствующей мишенью составляет менее примерно 10% от связывания антитела с мишенью, например, по результатам измерения с помощью радиоиммуноанализа (РИА). Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, антитело, которое специфично связывается с мишенью, имеет константу диссоциации (Kd), составляющую < 1 мкМ, < 100 нМ, < 10 нМ, < 1 нМ или < 0,1 нМ.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, антитело специфично связывается с белковым эпитопом, который является консервативным среди белков из разных видов. Согласно другому варианту реализации изобретения, специфичное связывание может включать, но не требует исключительного связывания.

При использовании в настоящем изобретении употребление термина в единственном числе включают ссылку на множественное число указанного термина, если иное явно не следует из контекста. Таким образом, например, ссылка на "нейрегулин" или "пептид нейрегулин" включает смеси таких нейрегулинов, изоформ нейрегулина и/или нейрегулин-подобных полипептидов. Ссылка на "лекарственную форму" или "способ" включает одну или более лекарственных форм, способов и/или этапов такого типа, как описано в настоящем изобретении и/или очевидно специалистам в данной области техники при прочтении настоящего изобретения.

Термин "полипептид" относится к полимеру аминокислот и его эквиваленту и не относится к конкретной длине продукта; таким образом, "пептиды" и "белки" включены в определение полипептида. Определение "полипептиды" включает также "антитела", как определено в настоящем изобретении. "Участок полипептида" относится к сегменту полипептида, который может содержать, например, один или более доменов или мотивов (например, полипептидный участок антитела может содержать, например, один или более определяющих комплементарность участков (complementarity determining region, CDR). Термин "фрагмент" относится к части полипептида, предпочтительно содержащей по меньшей мере 20 или по меньшей мере 50 следующих друг за другом аминокислот указанного полипептида.

Если иное не следует из контекста, "производное" представляет собой полипептид или его фрагмент, содержащий одну или более не консервативных или консервативных аминокислотных замен по сравнению со вторым полипептидом (также называемым "вариантом"); или полипептид или его фрагмент, который модифицирован путем ковалентного присоединения второй молекулы, например, путем присоединения гетерологичного полипептида или путем гликозилирования, ацетилирования, фосфорилирования и т.д. Определение "производное" также включает, например, полипептиды, содержащие один или более аналогов аминокислот (например, неприродные аминокислоты и т.д.), полипептиды с незамещенными связями, а также другими модификациями, известными в данной области техники, как природными, так и неприродными.

"Выделенный" полипептид представляет собой полипептид, который идентифицировали и отделили и/или восстановили из компонентов его природного окружения. Компоненты примеси из его природного окружения представляют собой материалы, которые мешают диагностическому или терапевтическому применению полипептида и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворы. Выделенный полипептид включает выделенное антитело или его фрагмент или производное.

Термин "примерно" при использовании в настоящем изобретении означает в количественном выражении плюс или минус 5% или, согласно другому варианту реализации изобретения, плюс или минус

10% или, согласно другому варианту реализации изобретения, плюс или минус 15% или, согласно другому варианту реализации изобретения, плюс или минус 20%.

Если иное не указано, все технические и научные термины, используемые в настоящем изобретении, имеют такое же значение, как обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой относится изобретение. Несмотря на то, что любые способы и материалы, подобные или эквивалентные способам и материалам, описанным в настоящем изобретении, могут использоваться при практическом осуществлении или при тестировании настоящего изобретения, в настоящем изобретении описаны предпочтительные способы и материалы. Все публикации, упомянутые в настоящем изобретении, включены в настоящее изобретение посредством ссылки в целях раскрытия и описания материала, в связи с которым указанная ссылка была цитирована.

Рекомбинантный слитый белок - антитело.

Согласно настоящему изобретению, применяется рекомбинантный слитый белок, содержащий моноклональное антитело, слитое с фрагментом изоформы белка нейрегулина-1 для применения для лечения различных сердечно-сосудистых и неврологических симптомов. Согласно типичным вариантам реализации изобретения, антитело является специфическим в отношении ERBB3 (HER3).

При использовании в настоящем изобретении, термин "антитело" относится к белку, содержащему один или более полипептидов, по существу или частично кодируемых генами иммуноглобулина или фрагментами генов иммуноглобулина. Известные гены иммуноглобулинов включают гены константных участков каппа, лямбда, альфа, гамма, дельта, эpsilon и мю, а также большое количество генов переменных участков иммуноглобулина. Легкие цепи классифицируются как каппа или лямбда. Тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эpsilon и, в свою очередь, определяют классы иммуноглобулинов - IgG, IgM, IgA, IgD и IgE соответственно. Типичная структурная единица иммуноглобулина (например, антитела) содержит тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, где каждая пара имеет одну "легкую" (примерно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (примерно 50-70 кДа). N-конец каждой цепи определяет переменный участок, содержащий примерно от 100 до 110 или более аминокислот, отвечающих главным образом за распознавание антигена. Термины переменный участок легкой цепи (VL) и переменный участок тяжелой цепи (VH) относятся к указанным легким и тяжелым цепям соответственно.

Антитела существуют в виде интактных иммуноглобулинов или в виде ряда хорошо охарактеризованных фрагментов, полученных путем переваривания с помощью различных пептидаз. Таким образом, например, пепсин переваривает антитело ниже дисульфидных связей в шарнирном участке с получением F(ab')₂ - димера Fab, который сам по себе является легкой цепью, присоединенной к VH-CH1 с помощью дисульфидной связи. F(ab')₂ может быть восстановлен при мягких условиях с разрушением дисульфидной связи в шарнирном участке, приводящим, таким образом, к превращению димера F(ab')₂ в мономер Fab'. Мономер Fab' по существу представляет собой Fab с частью шарнирного участка (для более подробного описания других фрагментов антител см. Fundamental Immunology, W. E. Paul, ed., Raven Press, New York (1999)). Тогда как различные фрагменты антитела определяются на основе переваривания интактного антитела, специалисту в данной области техники будет очевидно, что такие фрагменты Fab' и т.д. могут быть синтезированы de novo химическим путем или с использованием метода рекомбинантной ДНК. Таким образом, термин "антитело" при использовании в настоящем изобретении также включает фрагменты антитела, либо полученные путем модификации целого антитела, либо синтезированные de novo с использованием методов рекомбинантной ДНК. Антитела включают одноцепочечные антитела, включая одноцепочечные Fv-антитела (sFv или scFv), в которых переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи объединены вместе (прямо или через пептидный линкер) с образованием непрерывного полипептида. Антитела включают однодоменные антитела, которые содержат фрагмент антитела, состоящий из одного мономерного переменного домена антитела, который способен связываться селективно с доменом антигена. Примеры однодоменных антител включают фрагменты VHH, которые были исходно выделены из верблюдовых.

Домен антитела слитого белка необязательно содержит всю или часть молекулы иммуноглобулина и необязательно содержит весь или часть переменного участка иммуноглобулина (т.е. область специфичности для связанного с заболеванием антигена) и необязательно содержит участок (участки), закодированный геном V и/или геном D и/или геном J.

Как объясняется выше (см. Определения, выше), антитела, используемые в настоящем изобретении, необязательно включают F(ab)₂, F(ab')₂, Fab, Fab', scFv, однодоменные антитела и т.д. в зависимости от конкретных требований согласно варианту реализации изобретения. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, используются белки слияния, содержащие домены IgG. Однако другие варианты реализации изобретения включают альтернативные иммуноглобулины, такие как IgM, IgA, IgD и IgE. Более того, все возможные изоформы различных иммуноглобулинов также включены согласно вариантам реализации настоящего изобретения. Таким образом, все из IgG1, IgG2, IgG3 и т.д. представляют собой возможные молекулы в доменах слитых белков антитело-иммуностимулятор, используемых согласно изобретению. Помимо возможности выбора типа и изоформа иммуноглобулина, различные варианты реализации изобретения включают различные шарнирные участки (или их функциональные эквиваленты).

Такие шарнирные участки обеспечивают подвижность между различными доменами слитых белков антитело-иммуностимулятор. См., например, Penichet, et al. 2001 "Antibody-cytokine fusion proteins for the therapy of cancer" *J Immunol Methods* 248:91-101.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, mAb, которое содержится в рекомбинантном белке слияния согласно изобретению, является моноспецифичным в отношении ErbB3 (HER3).

Человеческий HER3 (ErbB-3, ERBB3, c-ErbB-3, c-ErbB3, рецепторная тирозин-протеинкиназа ErbB-3) кодирует член семейства рецепторных тирозинкиназ рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR), которое также включает HER1 (также известный как EGFR), HER2 и HER4 (Kraus, M.H. et al, *PNAS* 86 (1989) 9193-9197; Plowman, G.D. et al, *PNAS* 87 (1990) 4905-4909; Kraus, M.H. et al, *PNAS* 90 (1993) 2900-2904). Подобно прототипному рецептору эпидермального фактора роста, трансмембранный рецептор HER3 состоит из внеклеточного лиганд-связывающего домена (ECD), домена димеризации в пределах ECD, трансмембранного домена, внутриклеточного протеин-тирозинкиназного домена (TKD) и С-концевого домена фосфорилирования. Указанный мембраносвязанный белок HER3 содержит домен связывания херегулина (HRG) в пределах внеклеточного домена, но не активный киназный домен. Таким образом, он может связывать указанный лиганд, но не передает сигнал в клетку посредством фосфорилирования белка. Однако он формирует гетеродимеры с другими членами семейства HER, которые обладают киназной активностью. Гетеродимеризация приводит к активации опосредованного рецептором сигнального пути и трансфосфорилированию его внутриклеточного домена. Образование димера между членами семейства HER увеличивает сигнальный потенциал HER3 и может приводить не только к диверсификации сигнала, но также к амплификации сигнала. Например, гетеродимер HER2/HER3 индуцирует один из наиболее важных митогенных сигналов через путь PI3K и AKT среди членов семейства HER (Sliwkowski M.X., et al, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 14661-14665; Alimandi M, et al, *Oncogene.* 10 (1995) 1813- 1821; Hellyer, N.J., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 42153-4261; Singer, E., *J. Biol.*

Согласно одному варианту реализации изобретения, человеческий белок ERBB3 содержит следующую аминокислотную последовательность, предложенную в GenBank AAH02706,1 и описанную в SEQ ID NO: 1:

```
MRANDALQVLGLLFLSARGSEVGNLSQAVCPGTLNGLSVTGDAENQYQTLTKLYERCE
VVMGNLEIVLTGHNADLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVVRGTQVYDGGK
AIFVMLNYNTNSSHALRQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLCMDTIDWRDIVRDRDAEI
VVKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPSEDCQTLTKTICAPQCNGHCFGNPNQCCHDECA
GGCSGPQDTCFACRHFNDSGACVPRCPQLVYNKLTFLQLEPNPHTKYQYGGVCVASC
PHNFVVDQTSVCRACPPDKMEVDKNGLKMCEPCGGLCPKAF (SEQ ID NO: 1).
```

Следует понимать, что последовательность ERBB3 (HER3), на которую нацелено антитело в соответствии со способами и композициями согласно настоящему изобретению, может представлять собой изомер, гомолог или вариант последовательности SEQ ID NO: 1.

Согласно одному варианту реализации изобретения, mAb рекомбинантного слитого белка, предложенного в настоящем изобретении, представляет собой mAb против Her3, которое ингибирует сигналинг NRG-1 через ErbB3 (HER3).

Согласно конкретному варианту реализации изобретения, mAb, которое содержится в рекомбинантном белке слияния согласно изобретению, включает mAb против Her3. Такие антитела против HER3 могут включать, но не ограничиваются указанными, патритумаб, серибантумаб (полностью человеческое mAb), LJM716, KTN3379, AV-203, REGN1400, GSK2849330 или MM-141. Такие антитела также могут быть выбраны из любых из следующих форм, включая химерные, биспецифичные, нечеловеческие, полностью человеческие или гуманизированные формы, при условии, что они связываются с человеческим ERBB3 (HER3) и ингибируют опосредованный им сигналинг. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитело против HER3 имеет человеческое происхождение.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, термин "антитело" включает различные формы структур антитела, включая, но не ограничиваясь указанными, целые антитела и фрагменты антител. Антитело согласно изобретению предпочтительно представляет собой человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело, или другое генетически модифицированное антитело, при условии сохранения характерных свойств согласно изобретению. "Фрагменты антитела" включают часть или полноразмерное антитело, предпочтительно, его переменный домен или по меньшей мере его антиген-связывающий сайт. Примеры фрагментов антител включают диатела, одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител. scFv-антитела, например, описаны в источнике Huston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-88. Кроме того, фрагменты антитела включают одноцепочечные полипептиды, имеющие характеристики домена V_H, а именно, способность к ассоциации с доменом V_L, или характеристики связывания домена V_L с соответствующим антигеном, где указанный соответствующий антиген способен собираться вместе с доменом V_H в функциональный антиген-связывающий сайт и обеспечивать, таким образом, свойства антитела согласно изобретению. Термины "моноклональное антитело" или "композиция моноклонального антитела" при использовании в

настоящем изобретении относятся к препарату молекул антител, имеющих одинаковый аминокислотный состав.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, химерное антитело можно применять в композициях и способах, предложенных в настоящем изобретении. Согласно одному варианту реализации изобретения, термин "химерное антитело" относится к моноклональному антителу, содержащему переменный участок, т.е. связывающий участок, от мыши и по меньшей мере часть константного участка, произошедшего из другого источника или вида, как правило, полученного с помощью методов рекомбинантной ДНК. Химерные антитела, содержащие мышинный переменный участок и человеческий константный участок, являются особо предпочтительными. Такие крысиные/человеческие химерные антитела являются продуктом экспрессии генов иммуноглобулина, содержащих сегменты ДНК, кодирующие переменные участки крысиного иммуноглобулина, и сегменты ДНК, кодирующие константные участки человеческого иммуноглобулина. Другие формы "химерных антител", включенных согласно настоящему изобретению, представляют собой формы, в которых класс или подкласс был модифицирован или изменен по сравнению с классом или подклассом исходного антитела. Такие "химерные" антитела также называются "антителами с переключением классов". Способы получения химерных антител включают стандартные методы рекомбинантной ДНК и генной трансфекции, хорошо известные в настоящее время в данной области техники. См., например, Morrison, S.L., et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; патенты США № 5202238 и 5204244.

Согласно одному варианту реализации изобретения, гуманизованное антитело можно использовать в композициях и способах, предложенных в настоящем изобретении. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, термин "гуманизованное антитело" или "гуманизованная версия антитела" относится к антителу, в котором каркас или "определяющие комплементарность участки (CDR)" были модифицированы таким образом, что они содержат CDR-участки иммуноглобулина другой специфичности по сравнению со специфичностью исходного иммуноглобулина. Согласно другим вариантам реализации изобретения, участки CDR VH и VL привиты в каркасный участок человеческого антитела с получением "гуманизованного антитела". См., например, Riechmann, L., et al, Nature 332 (1988) 323-327; и Neuberger, M.S., et al, Nature 314 (1985) 268-270. Переменные каркасные участки тяжелой и легкой цепи могут быть получены из одной и той же или из разных последовательностей человеческого антитела. Последовательности человеческого антитела могут представлять собой последовательности природных человеческих антител. Переменные каркасные участки человеческих тяжелых и легких цепей перечислены, например, в источнике Lefranc, M.-P., Current Protocols in Immunology (2000) - Appendix IP A, 1P, 1-A, 1P, 37, и доступны в системе IMGT - международной информационной системе Immunogenetics information system® (<http://imgt.cines.fr>), или на сайте <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk>. Необязательно каркасный участок может быть модифицирован с помощью дополнительных мутаций. Особо предпочтительные CDR соответствуют CDR, представляющим собой последовательности, распознающие антигены, указанные выше для химерного антитела. Термин "гуманизованное антитело" при использовании в настоящем изобретении также включает такие антитела, которые были модифицированы в константном участке для обеспечения свойств согласно изобретению, в частности, в отношении связывания компонента комплемента Iq (C1q) и/или связывания Fc-рецептора (FcR), например, путем "переключения классов", т.е. изменения или мутации частей Fc (например, переключения с IgG1 на IgG4 и/или мутации IgGMgG4). Предполагается, что термин "человеческое антитело" при использовании в настоящем изобретении включает антитела, содержащие переменные и константные участки, происходящие из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие антитела хорошо известны в данной области техники (van Dijk, M.A., and van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374). Человеческие антитела также могут быть получены в трансгенных животных (например, мышах), которые способны при иммунизации продуцировать полный репертуар или выбранные человеческие антитела в отсутствие эндогенной продукции иммуноглобулина. Перенос генетической информации иммуноглобулина зародышевой линии человека в зародышевую линию такой мутантной мыши будет приводить к продукции человеческого антитела при антигенной стимуляции (см., например, Jakobovits, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al, Nature 362 (1993) 255-258; Brueggemann, M.D., et al., Year Immunol. 7 (1993) 33-40). Человеческие антитела также можно получать из библиотек фагового дисплея (Hoogenboom, H.R., и Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., et al., J. Mol. Biol. 222 (1991) 581- 597). Для получения человеческих моноклональных антител также доступны методы в соответствии с источниками Cole, A., et al., Monoclonal Antibodies and Anticancer Therapy, Liss, A.L., p. 77 (1985); и Boerner, P., et al., J. Immunol. 147 (1991) 86-95). Как уже упоминалось для гуманизованных антител согласно изобретению, термин "человеческое антитело" при использовании в настоящем изобретении также включает такие антитела, которые модифицированы в константном участке для обеспечения свойств согласно изобретению.

Согласно одному конкретному варианту реализации настоящего изобретения, mAb, которое содержится в рекомбинантном белке слияния, предложенном в настоящем изобретении, содержит по меньшей мере одну мутацию в домене или участке Fc.

Предполагается, что термин "рекомбинантное человеческое антитело" при использовании в на-

стоящем изобретении включает все человеческие антитела, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены с помощью рекомбинантных способов, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, например, клетки NS0 или CHO, или из животного (например, мыши), которое является трансгенным для человеческих генов иммуноглобулинов, или антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина. Такие рекомбинантные человеческие антитела содержат перегруппированные переменные и константные участки. Рекомбинантные человеческие антитела согласно изобретению были подвергнуты *in vivo* соматической гипермутации. Таким образом, аминокислотные последовательности участков VH и VL рекомбинантного антитела представляют собой последовательности, которые, несмотря на то что относятся и происходят из последовательностей VH и VL зародышевой линии человека, могут не существовать в природе в пределах репертуара антител зародышевой линии человека *in vivo*.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, термины "который связывается с человеческим HER3", "который специфично связывается с человеческим HER3" или "антитело против HER3" являются взаимозаменяемыми и относятся к антителу, которое специфично связывается с человеческим антигеном HER3 со значением KD, составляющим примерно $4,81 \times 10^{-10}$ моль/л или ниже, при 25°C. Аффинность связывания определяется с помощью стандартного анализа связывания при 25°C, такого как метод поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, Швеция). Таким образом, "антитело, которое связывается с человеческим HER3", при использовании в настоящем изобретении относится к антителу или конкретной его части, которая связывается с человеческим антигеном HER3 с аффинностью связывания со значением KD в диапазоне $1,0 \times 10^{-8}$ моль/л - $1,0 \times 10^{-13}$ моль/л при 25°C, и предпочтительно со значением KD, составляющим $4,81 \times 10^{-10}$ моль/л или ниже, при 25°C.

Согласно другому аспекту, антитело против HER3, содержащееся в рекомбинантном белке слияния, описанном в настоящем изобретении, содержит переменный участок тяжелой цепи (VH) и переменный участок легкой цепи (VL). Согласно одному варианту реализации изобретения, антитело содержит последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 соответственно и обладает одним или более из следующих свойств: ингибирование фосфорилирования HER3 в опухолевых клетках, ингибирование фосфорилирования АКТ в опухолевых клетках, ингибирование сигналинга через ErbB3 (HER3) и ингибирование пролиферации опухолевых клеток.

Согласно одному варианту реализации изобретения, mAb против Her3, предложенное в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность VH, описанную в SEQ ID NO: 2:

Тяжелая цепь:

QVQLQQWGAG	LLKPSETLSL	TCAVYGGSF	GSFGYYWSWIRQP
PGKGLEWIGE	INHSGSTNYN	PSLKSRTVIS	VETSKNQFSLKLSSVTAADT
AVYYCARDKW	TWYFDLWGRG	TLVTVSSAST	KGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYF	PEPVTVSWNS	GALTSGVHTF	PAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTQTYIC	NVNHKPSNTK	VDKRVEPKSC	DKTHTCPPCPAPEFLGGPAV
FLFPPPKPDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKALPAPIEKTKAK
GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NVFCSCVMHE	ALHAHYTQKLSLSPGK

(SEQ ID NO: 2).

Согласно одному варианту реализации изобретения, mAb против Her3, предложенное в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность VL последовательности SEQ ID NO: 3:

Легкая цепь:

DIEMTQSPDS	LAVSLGERAT	INCRSSQS	SVLYSSSNRNYLA
WYQQNPGQPP	KLLIYWASTR	ESGVPDRFSG	SGSGTDFTLTISSLQAEDVA
VYYCQYYST	PRTFGQGTKV	EIKRTVAAPS	VFIFPSDEQLKSGTASVVC
LLNFPYPREA	KVQWKVDNAL	QSGNSQESVT	EQDSKDSTYSLSSTLTLSKA

DYEKHKVYAC EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 3).

Согласно одному варианту реализации изобретения, антитело против HER3 согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну мутацию в Fc-участке. Согласно другому варианту реализации изобретения, зрелое антитело против HER3 (т.е. с отсутствием сигнального пептида) согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну мутацию в аминокислотах 234, 239, 434 или их комбинации, где, согласно другим вариантам реализации изобретения, мутации аминокислот включают по меньшей мере одну из следующих мутаций по типу замены: L234F, S239A, N434A или их комбинацию. Согласно другому варианту реализации изобретения, мутации аминокислот 234 и/или 239 подавляют эффекторные функции антитела против HER3. Согласно другому варианту реализации изобре-

ния, мутация аминокислоты 434 увеличивает время полувыведения антитела у субъекта.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, одна или более мутаций в Fc-участке снижают эффекторную функцию. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, сниженная эффекторная функция включает сниженную аффинность антитела против HER3 для одного или более Fc рецепторов. Рецепторы FcR могут представлять собой FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa (158F), FcγRIIIa (158V) и C1q. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, сниженная аффинность включает повышение константы диссоциации примерно на 1 порядок величины или более. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, введение одной или более мутаций Fc повышает KD антитела против HER3 содержащего его слитого белка в отношении FcγRI от $2,81 \times 10^{-9}$ М до $1,03 \times 10^{-8}$ М. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, введение одной или более мутаций Fc повышает KD антитела против HER3 содержащего его слитого белка в отношении FcγRIIa от $3,95 \times 10^{-7}$ М до $1,35 \times 10^{-6}$ М. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, введение одной или более мутаций Fc повышает KD антитела против HER3 содержащего его слитого белка в отношении FcγRIIb от $1,03 \times 10^{-7}$ М до $1,52 \times 10^{-6}$ М. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, введение одной или более мутаций Fc повышает KD антитела против HER3 содержащего его слитого белка в отношении FcγRIIIa (158F) от $6,37 \times 10^{-8}$ М до $1,18 \times 10^{-7}$ М. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, введение одной или более мутаций Fc повышает KD антитела против HER3 содержащего его слитого белка в отношении FcγRIIIa (158V) от $3,41 \times 10^{-8}$ М до $9,10 \times 10^{-8}$ М.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитело против HER3 или содержащий его рекомбинантный слитый белок связывается с FcγRI с равновесной константой диссоциации (KD), превышающей или равной $1,03 \times 10^{-8}$ М. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитело против HER3 или содержащий его рекомбинантный слитый белок содержит одну или более мутаций Fc и связывается с FcγRIIa с KD, превышающей или равной $1,35 \times 10^{-6}$ М. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитело против HER3 или содержащий его рекомбинантный слитый белок содержит одну или более мутаций Fc и связывается с FcγRIIb с KD, превышающей или равной $1,5 \times 10^{-6}$ М. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитело против HER3 или содержащий его рекомбинантный слитый белок содержит одну или более мутаций Fc и связывается с FcγRIIIa (158F) с KD, превышающей или равной $1,18 \times 10^{-7}$ М. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитело против HER3 или содержащий его рекомбинантный слитый белок содержит одну или более мутаций Fc и связывается с FcγRIIIa (158V) с KD, превышающей или равной $9,10 \times 10^{-8}$ М.

Термин "эффекторная функция (функции) антитела" при использовании в настоящем изобретении относится к функции, осуществляемой Fc участком (участками) Ig. На такую функцию может влиять, например, связывание эффекторного участка (участков) Fc с Fc-рецептором на иммунной клетке, обладающей фагоцитической или литической активностью, или связывание эффекторного участка (участков) Fc с компонентами системы комплемента.

Согласно одному варианту реализации изобретения, антитело против HER3 не вызывает антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ). Термин "антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ)" относится к лизису человеческих клеток-мишеней, вызванному антителом согласно изобретению в присутствии эффекторных клеток.

Согласно одному варианту реализации изобретения, антитело согласно изобретению является гликозилированным. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, гликозилирование представляет собой N-гликозилирование. Согласно другим вариантам реализации изобретения, гликозилирование представляет собой O-гликозилирование.

В контексте рекомбинантного слитого белка, предложенного в настоящем изобретении, и в соответствии с настоящим изобретением, антитела, входящие в состав рекомбинантного белка слияния, могут быть получены с помощью рекомбинантных методов. Такие методы широко известны в данной области техники и включают белковую экспрессию в прокариотических или эукариотических клетках с последующим выделением полипептида антитела и, как правило, очисткой до фармацевтически приемлемой степени чистоты. Для белковой экспрессии нуклеиновые кислоты, кодирующие легкую и тяжелую цепи или их фрагменты, встраивают в векторы экспрессии с помощью стандартных методов. Экспрессию осуществляют в подходящих прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах, таких как клетки CHO, клетки NS0, клетки SP2/0, клетки HEK293, клетки COS, клетки дрожжей или *E. coli*, и антитело восстанавливают из указанных клеток (из супернатанта или после клеточного лизиса). Рекомбинантная продукция антител хорошо известна согласно уровню техники и описана, например, в обзорных статьях Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al, *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., *Drug Res.* 48 (1998) 870-880. Антитела могут присутствовать в целых клетках, в клеточных лизатах или в частично очищенной или по существу чистой форме. Очистку осуществляют для устранения других клеточных компонентов или других примесей, например, других клеточных нуклеиновых кислот или белков, с помощью стандартных методов, включая колоночную хроматографию и другие хорошо известные в данной области техники методы (см. Ausubel, F., et al, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Inter-

science, New York (1987)). Экспрессия в клетках NSO описана, например, в источнике Barnes, L.M., et al, Cytotechnology 32 (2000) 109-123; Barnes, L.M., et al, Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270. Временная экспрессия описана, например, в источнике Durocher, Y., et al, Nucl. Acids. Res. 30 (2002) E9. Клонирование переменных доменов описано в источниках Orlandi, R., et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289; Norderhaug, L., et al, J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87. Предпочтительная система временной экспрессии (HEK 293) описана в источниках Schlaeger, E.-J. и Christensen, K., Cytotechnology 30 (1999) 71-83, и Schlaeger, E.-J., J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199. Моноклональные антитела подходящим образом отделяют из культуральной среды с помощью стандартных процедур очистки иммуноглобулинов, таких как, например, очистка с помощью связанной с белком А сепарозы, гидроксиапатитная хроматография, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография. ДНК и РНК, кодирующие моноклональные антитела, легко выделяют и секвенируют с помощью стандартных процедур. Гибридомные клетки могут служить в качестве источника таких ДНК и РНК. После выделения ДНК можно встраивать в векторы экспрессии, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки HEK 293, клетки CHO или клетки миеломы, не продуцирующие в другом случае белок иммуноглобулин, для достижения синтеза рекомбинантного моноклонального антитела в указанных клетках-хозяевах.

Переменные домены тяжелой и легкой цепи согласно изобретению объединяют с последовательностями промоторного участка, участка инициации трансляции, константного участка, 3'-нетранслируемого участка, участка полиаденилирования и терминации транскрипции с образованием конструкторов вектора экспрессии. Конструкторы экспрессии тяжелой и легкой цепи можно объединять в один вектор, ко-трансфицировать, последовательно трансфицировать или раздельно трансфицировать в клетки-хозяева, которые затем сливают с получением одной клетки-хозяина, экспрессирующей обе цепи.

Очевидно, что антитела вводят субъекту в терапевтически эффективном количестве, которое представляет собой количество интересующего соединения или комбинации, которая будет вызывать биологический или медицинский ответ ткани, системы, животного или человека, искомый исследователем, ветеринаром, лечащим врачом или другим клиницистом.

Рекомбинантный слитый белок - нейрегулин.

Согласно одному варианту реализации изобретения, рекомбинантный слитый белок, предложенный в настоящем изобретении, содержит фрагмент белка NRG-1. Белки NRG могут связываться с рецептором ErbB4 на поверхности клеток миокарда, непрерывно активировать сигнальный путь PI3K/AKT в клетке и менять структуру клеток миокарда, улучшая таким образом функцию клеток миокарда.

При использовании в настоящем изобретении, "нейрегулин" или "NRG" относится к белкам или пептидам, которые могут связывать и активировать ErbB3, ErbB4 или их гетеродимеры или гомодимеры, и включает изоформы нейрегулина, EGF-подобный домен нейрегулина, полипептиды, содержащие EGF-подобный домен нейрегулина, мутанты и производные нейрегулина и любой тип нейрегулин-подобных генных продуктов, которые могут активировать указанные выше рецепторы. Нейрегулин также включает белки, пептиды, фрагменты и соединения NRG-1, NRG-2, NRG-3 и NRG-4, которые обладают функциями нейрегулина. Согласно предпочтительным вариантам реализации изобретения, нейрегулин представляет собой белок или пептид, который может связывать и активировать гетеродимеры ErbB2/ErbB4 или ErbB2/ErbB3, в качестве неограничивающего примера, пептиды согласно настоящему изобретению включают фрагмент изоформы NRG-1β2, т.е. фрагмент из 177-237 аминокислот, который содержит EGF-подобный домен, имеющий следующую аминокислотную последовательность:

SHLVKCAEKEKTFVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKAAE

LYQ (SEQ ID NO: 4). NRG белки согласно настоящему изобретению могут активировать указанные выше рецепторы и регулировать их биологические функции, например, стимулировать синтез ацетилхолиновых рецепторов в скелетных мышечных клетках, стимулировать дифференцировку и выживаемость кардиомиоцитов и синтез ДНК. Специалистам в данной области техники хорошо известно, что мутация одной аминокислоты в некритичном участке в целом не будет менять биологическую активность полученного в результате белка или полипептида (см., например, Watson et al., Molecular Biology of Gene, 4th Edition, 1987, Bejamins/Cummings Pub.co., p. 224). Белки NRG согласно изобретению могут быть выделены из природных источников, могут быть модифицированы посредством технологий рекомбинации, искусственного синтеза или других способов.

При использовании в настоящем изобретении "подобный эпидермальному фактору роста домен" или "EGF-подобный домен" относится к фрагменту полипептида, закодированному геном нейрегулина, который связывает и активирует ErbB3, ErbB4, или его гетеродимеры или гомодимеры, включая гетеродимеры с ErbB2, и структурно подобен связывающему рецептор EGF участку, как описано в международной публикации WO 00/64400, Holmes et al., Science, 256:1205-1210 (1992); патентах США № 5530109 и 5 716 930; источниках 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); и международной публикации WO 97/09425, содержание которых полностью включено в настоящее изобретение посредством ссылки. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, EGF-подобный

домен связывает и активирует гетеродимеры ErbB2/ErbB4 или ErbB2/ErbB3. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, EGF-подобный домен содержит аминокислотную последовательность рецептор-связывающего домена NRG-1. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, EGF-подобный домен относится к аминокислотным остаткам 177-226, 177-237 или 177-240 NRG-1. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, EGF-подобный домен содержит аминокислотную последовательность рецептор-связывающего домена нейрегулина-2 (NRG-2, также известного в данной области техники как DON1, HRG2 и NTAK). Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, EGF-подобный домен NRG-2 содержит последовательность HARKCNETAKSYCVNGGVCYYIEGINQLSCKCPNGFFGQRCL (SEQ ID NO: 15).

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, EGF-подобный домен содержит аминокислотную последовательность рецептор-связывающего домена нейрегулина 3 (NRG-3, также известного в данной области техники как HRG3 и про-NRG3). Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, EGF-подобный домен NRG-3 содержит последовательность HFKPCRDKDLAYCLNDGECFVIETLTGSHKHCRCKEYQGVRC D (SEQ ID NO: 16).

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, EGF-подобный домен содержит аминокислотную последовательность рецептор-связывающего домена нейрегулина 4 (NRG-4, также известного в данной области техники как HER4). Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, EGF-подобный домен NRG-4 содержит последовательность HEERCGPSHKSFCLNGGLCYVIPTIPSPFCRCVENYTGARCE (SEQ ID NO: 17).

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, EGF-подобный домен содержит аминокислотную последовательность Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro (SEQ ID NO: 18), как описано в патенте США № 5 834 229.

Согласно одному варианту реализации изобретения, белок NRG-1, представленный в рекомбинантном белке слияния, описанном в настоящем изобретении, представляет собой изоформу NRG-1 β 2a.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, активный фрагмент NRG-1 содержит связывающий домен ERBB3/4. Согласно другому связанному варианту реализации изобретения, NRG-1 связывается и индуцирует сигналинг через ErbB4 (HER4). Согласно другим вариантам реализации изобретения, mAb ингибирует сигналинг NRG-1 через ErbB3 (HER3). Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, активный белковый фрагмент NRG-1 содержит активный домен NRG-1.

Рекомбинантный слитый белок - композиции.

Согласно одному варианту реализации изобретения, в рекомбинантном белке слияния, описанном в настоящем изобретении, NRG-1 слит с С-концом тяжелой цепи антитела против HER3 с использованием линкера. Согласно другому связанному аспекту, NRG-1 присоединен к линкеру через первую (1-ую) аминокислоту на N-конце NRG-1, которая, согласно одному варианту реализации изобретения, представляет собой аминокислоту серин (S или Ser). Конкретный рекомбинантный слитый белок, используемый в настоящем изобретении, может быть необязательно получен или создан с помощью любого метода, известного в данной области техники (включая получение из коммерческих источников). Например, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие соответствующий каркас антитела, необязательно клонируют и лигируют в соответствующие векторы (например, векторы экспрессии, например, для прокариотических или эукариотических организмов). Кроме того, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие молекулу изоформы NRG-1 β 2a, необязательно клонируют в тот же вектор в соответствующей ориентации и положении таким образом, чтобы экспрессия с вектора приводила к получению слитого белка антитело-изоформа NRG-1 β 2a. Для некоторых необязательных вариантов реализации изобретения также требуется постэкспрессионная модификация, например, сборка субъединиц антитела. Методы и уровень техники для указанных выше (и подобных) манипуляций хорошо известны специалистам в данной области. Надлежащие инструкции можно найти, например, в следующих источниках: Sambrook et al., *Molecular Cloning-A Laboratory Manual* (2nd Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989, и *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel et al., eds., *Current Protocols* (созданное совместное предприятие между Greene Publishing Associates, Inc. и John Wiley & Sons, Inc., дополнено в ходе 1999). Согласно некоторым альтернативным вариантам реализации изобретения, домен антитела и изоформу NRG-1 β 2a собирают после экспрессии посредством, например, химических способов. Согласно одному варианту реализации изобретения, настоящее изобретение обеспечивает композицию, например, фармацевтическую композицию, содержащую рекомбинантный слитый белок согласно настоящему изобретению.

Согласно одному варианту реализации изобретения, рекомбинантный слитый белок стимулирует пролиферацию, дифференцировку и выживаемость кардиомиоцитов. Согласно другому варианту реализации изобретения, рекомбинантный слитый белок стимулирует пролиферацию, дифференцировку и выживаемость клеток сердечной ткани. Согласно одному варианту реализации изобретения, рекомбинантный слитый белок стимулирует пролиферацию, дифференцировку и выживаемость кардиомиоцитов без стимуляции рака и/или опухолевого роста. Согласно другому варианту реализации изобретения, рекомбинантный слитый белок стимулирует пролиферацию, дифференцировку и выживаемость клеток

сердечной ткани без стимуляции рака или опухолевого роста.

Согласно одному варианту реализации изобретения, рак представляет собой аденокарциному, СПИД-ассоциированные типы рака, СПИД-ассоциированную лимфому, анальный рак, аноректальный рак, рак анального канала, рак аппендикса, детскую астроцитому мозжечка, базально-клеточную карциному, рак кожи (немеланомный), рак печени, рак внепеченочного желчного протока, рак внутриспеченочного желчного протока, рак мочевого пузыря, рак мочевыделительной системы и мочевого пузыря, рак кости и суставов, остеосаркому и злокачественную фиброзную гистiocитому, рак мозга, опухоль мозга, глиому ствола мозга, астроцитому мозжечка, астроцитому головного мозга/злокачественную глиому, эпендимому, медуллобластому, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, глиому зрительного пути и гипоталамуса, рак молочной железы, бронхиальные аденомы/карциномы, карциноидную опухоль, рак желудочно-кишечного тракта, рак нервной системы, лимфому нервной системы, рак центральной нервной системы, лимфому центральной нервной системы, рак шейки матки, детские типы рака, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронические миелопролиферативные расстройства, рак прямой кишки, колоректальный рак, кожную Т-клеточную лимфому, опухоль лимфоидной ткани, фунгоидный микоз, синдром Сезари, рак эндометрия, рак пищевода, экстракраниальную герминогенную опухоль, внегонадную герминогенную опухоль, рак внепеченочного желчного протока, рак глаза, интраокулярную меланому, ретинобластому, рак желчного пузыря, желудочный рак (рак желудка), карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, стромальную опухоль желудочно-кишечного тракта (СОЖКТ), герминогенную опухоль, эмбрионально-клеточную опухоль яичников, гестационную трофобластическую опухоль, глиому, рак головы и шеи, гепатоклеточный рак (рак печени), ходжкинскую лимфому, гипофарингеальный рак, интраокулярную меланому, рак глаза, опухоли островковых клеток (эндокринных клеток поджелудочной железы), саркому Капоши, рак почки, почечный рак, рак почек, рак гортани, острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, волосяно-клеточный лейкоз, рак губы и ротовой полости, рак печени, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, СПИД-ассоциированную лимфому, неходжкинскую лимфому, первичную лимфому центральной нервной системы, макроглобулинемию Вальденстрема, медуллобластому, меланому, интраокулярную меланому (меланому глаза), карциному из клеток Меркеля, злокачественную мезотелиому, мезотелиому, метастатический плоскоклеточный рак шеи, рак рта, рак языка, синдром множественной эндокринной неоплазии, фунгоидный микоз, миелодиспластические синдромы, миелодиспластические/миелолиферативные заболевания, хронический миелоидный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, множественную миелому, хронические миелолиферативные расстройства, носоглоточный рак, нейробластому, рак рта, рак ротовой полости, ротоглоточный рак, рак яичника, рак эпителия яичника, пограничную опухоль яичника, рак поджелудочной железы, рак островковых клеток поджелудочной железы, рак околоносовых пазух и носовой полости, рак парашитовидной железы, пениальный рак, рак глотки, феохромоцитому, пинеобластому и супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, опухоль гипофиза, плазмоклеточную опухоль/множественную миелому, плеврально-легочную бластому, рак предстательной железы, ректальный рак, рак почечной лоханки и мочеточника, переходноклеточный рак, ретинобластому, рабдомиосаркому, рак слюнной железы, семейство саркомных опухолей Юинга, саркому Капоши, саркому мягких тканей, эпителиодную саркому, синовиальную саркому, рак матки, саркому матки, рак кожи (немеланомный), рак кожи (меланому), карциному кожи из клеток Меркеля, рак тонкой кишки, саркому мягких тканей, плоскоклеточную карциному, рак желудка (желудочный рак), супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, рак яичка, рак горла, тимому, тимому и карциному тимуса, рак щитовидной железы, переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника и других мочевыделительных органов, гестационную трофобластическую опухоль, уретральный рак, рак эндометрия матки, саркому матки, рак тела матки, вагинальный рак, рак вульвы или опухоль Вильма.

Согласно другому варианту реализации изобретения, рекомбинантный слитый белок стимулирует пролиферацию, дифференцировку и выживаемость клеток центральной нервной системы (ЦНС). Согласно другому варианту реализации изобретения, рекомбинантный слитый белок стимулирует пролиферацию, дифференцировку и выживаемость клеток центральной нервной системы (ЦНС) без стимуляции рака и/или опухолевого роста. Согласно другому варианту реализации изобретения, рекомбинантный слитый белок имеет сниженную способность вызывать антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ).

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, рекомбинантный слитый белок стимулирует сигналинг HER2/4 в отличие от сигналинга HER2/3 по сравнению с потенциалом индукции сигналинга рекомбинантного NRG-1.

Согласно конкретному варианту реализации изобретения, рекомбинантный слитый белок содержит mAb против HER3, слитое или функционально связанное через С-конец тяжелой цепи антитела с изоформой NRG-1β2a последовательности SEQ ID NO: 4 с помощью линкера GGGGSGGGGS (G4S) (SEQ ID NO: 5). Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, можно применять одну или более копий линкера. Согласно другим вариантам реализации изобретения, в соответствии с настоящим изо-

бретением можно применять 2, 3, 4, или 5 копий линкера G4S или любого другого линкера, который, как известно в данной области техники, является подходящим для композиции, описанной в настоящем изобретении.

Термин "линкер" является принятым термином в данной области техники и относится к молекуле (включая, но не ограничиваясь указанными, немодифицированные или модифицированные нуклеиновые кислоты или аминокислоты) или группе молекул (например, 2 или более, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более), соединяющих два соединения, таких как два полипептида. Линкер может состоять из одной связывающей молекулы или может содержать связывающую молекулу и по меньшей мере одну спейсерную молекулу для отделения связывающей молекулы от соединения на конкретное расстояние.

Последовательность нуклеиновой кислоты является "функционально связанной", когда она находится в функциональной зависимости от другой последовательности нуклеиновых кислот. Например, предпоследовательность нуклеиновой кислоты или секреторная лидерная последовательность функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, если она экспрессируется в виде пре-протеина, который участвует в секреции указанного полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию указанной последовательности; или сайт связывания рибосомы функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен таким образом, что способствует трансляции. В целом, термин "функционально связанные" означает, что связываемые последовательности нуклеиновых кислот представляют собой непрерывную последовательность, а в случае секреторной лидерной последовательности, представляют собой непрерывную последовательность и находятся в одной рамке считывания. Однако энхансеры необязательно образуют непрерывные последовательности. Связывание может осуществляться, например, путем лигирования по удобным сайтам рестрикции. Если таких сайтов не существуют, можно использовать синтетические олигонуклеотидные адаптеры, линкеры или другие методы, известные в данной области техники. Согласно другому варианту реализации изобретения, "функционально связанный" также относится к функциональному спариванию отдельных аминокислотных последовательностей, пептидов или белков, как при спаривании антитела и фрагмента NRG-1, описанного в настоящем изобретении, через линкерную последовательность, также описанную в настоящем изобретении.

Согласно другому варианту реализации изобретения, тяжелая цепь mAb против Her3, содержащаяся в рекомбинантном белке слияния, предложенном в настоящем изобретении, кодируется последовательностью SEQ ID NO: 6:

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCCTTGTTGCTATAATAAAAGGTGTCCA
GTGTCAGGTGCAGCTGCAGCAGTGGGGAGCTGGACTGCTGAAGCCAAGCGAGACCC
TGTCTCTGACATGCGCCGTGTACGGAGGATCCTTCAGCGGATACTATTGGTCTTGGA
TCAGGCAGCCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCGAGATCAACCACTCTGGC
TCCACCAACTACAATCCCTCTCTGAAGTCCCGGGTGACCATCTCCGTGGAGACAAGC
AAGAATCAGTTTTCCCTGAAGCTGTCCAGCGTGACCGCCGCTGACACAGCCGTGTAC
TATTGCGCTAGGGACAAGTGGACCTGGTATTTTCGATCTGTGGGGAAGGGGCACCCT
GGTGACAGTGTCTTCCGCCTCTACAAAGGGCCCTCCGTGTTTCCTCTGGCTCCAAG
CTCTAAGAGCACCTCTGGAGGAACAGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGATTACTT
CCCTGAGCCAGTGACCGTGAGCTGGAACCTCTGGCGCCCTGACCTCCGGAGTGATAC
ATTTCCCGCTGTGCTGCAGTCCAGCGCCCTGTATAGCCTGTCTTCCGTGGTGACCGT
GCCTAGCTCTTCCCTGGGCACCCAGACATACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCTC
CAATACAAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCTAAGAGCTGTGATAAGACCCATACAT
GCCCACCATGTCCAGCTCCTGAGCTGCTGGGAGGACCTCCGTGTTCTGTTTCTCC
AAAGCCAAAGGACACCCTGATGATCTCTCGCACCCCTGAGGTGACATGCGTGGTGG
TGGACGTGTCCCACGAGGATCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTG
GAGGTGCATAATGCTAAGACCAAGCCTAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTATCG
GGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGTGACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACA
AGTGCAAGGTGAGCAATAAGGCCCTGCCAGCTCCCATCGAGAAGACCATCTCTAAG
GCCAAGGGCCAGCCAGAGAGCCTCAGGTGTATACACTGCCCCCTAGCCGCGAGGA
GATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCATCTGA
CATCGCTGTGGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCCGAGAACAATTATAAGACCACAC
CACCCGTGCTGGACTCCGATGGCAGCTTCTTTCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGATA
AGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTTCTGACGCGTGATGCACGAGGCCCTG
CACAATCATTATACACAGAAATCTCTGTCCCTGAGCCCAGGCAAGGGAGGAGGAGG
AAGCGGAGGAGGAGGCAGCTCTCATCTGGTGAAGTGTGCTGAGAAGGAGAAGACCT
TCTGCGTGAACGGCGGCGAGTGTATATGGTGAAGGACCTGTCTAATCCATCCAGAT
ACCTGTGCAAGTGTCCCAACGAGTTCACAGGCGATCGCTGCCAGAATTACGTGATG
GCCTCTTTTTATAAGGCTGAGGAGCTGTACCAGTAA (SEQ ID NO: 6).

Согласно одному варианту реализации изобретения, последовательность, описанная в SEQ ID NO: 6, не содержит Fc-мутаций. Согласно одному варианту реализации изобретения, SEQ ID NO: 6 также называется "NPCF".

Согласно одному варианту реализации изобретения, рекомбинантный слитый белок, предложенный в настоящем изобретении, содержит тяжелую цепь mAb против Her3. Согласно другому варианту реализации изобретения, тяжелая цепь mAb против Her3 кодируется последовательностью SEQ ID NO: 7:

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCCTTGTTGCTATAATAAAAGGTGTCCA
 TGTCAGGTGCAGCTGCAGCAGTGGGGAGCTGGACTGCTGAAGCCAAGCGAGACCC
 TGTCTCTGACATGCGCCGTGTACGGAGGATCCTTCAGCGGATACTATTGGTCTTGGA
 TCAGGCAGCCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCGAGATCAACCACTCTGGC
 TCCACCAACTACAATCCCTCTCTGAAGTCCCGGGTGACCATCTCCGTGGAGACAAGC
 AAGAATCAGTTTTCCCTGAAGCTGTCCAGCGTGACCGCCGCTGACACAGCCGTGTAC
 TATTGCGCTAGGGACAAGTGGACCTGGTATTTTCGATCTGTGGGGAAGGGGCACCCT
 GGTGACAGTGTCTTCCGCCTCTACAAAGGGCCCTCCGTGTTTCCCTCTGGCTCCAAG
 CTCTAAGAGCACCTCTGGAGGAACAGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGATTA
 CCTGAGCCAGTGACCGTGAGCTGGAACCTCTGGCGCCCTGACCTCTGGAGTGCATAC
 ATTTCCCGCTGTGCTGCAGTCCAGCGCCCTGTATAGCCTGTCTTCCGTGGTGACCGT
 GCCTAGCTCTTCCCTGGGCACCCAGACATACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCTC
 CAATACAAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCTAAGAGCTGTGATAAGACCCATACAT
 GCCCACCATGTCCAGCTCCTGAGTTCCTGGGAGGACCTGCCGTGTTCTGTTTCTCC
 AAAGCCAAAGGACACCCTGATGATCTCTCGACCCCTGAGGTGACATGCGTGGTGG
 TGGACGTGTCCCACGAGGATCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTG
 GAGGTGCATAATGCTAAGACCAAGCCTAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTATCG
 GGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACA
 AGTGCAAGGTGAGCAATAAGGCCCTGCCAGCTCCCATCGAGAAGACCATCTCTAAG
 GCCAAGGGCCAGCCAGAGAGCCTCAGGTGTATACACTGCCCCCTAGCCGCGAGGA
 GATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCATCTGA
 CATCGCTGTGGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCCGAGAACAATTATAAGACCACAC
 CACCCGTGCTGGACTCCGATGGCAGCTTCTTTCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGATA
 AGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTTCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTG
 CACGCTCATTATACACAGAAATCTCTGTCCCTGAGCCCAGGCAAGGGAGGAGGAGG
 AAGCGGAGGAGGAGGCAGCTCTCATCTGGTGAAGTGTGCTGAGAAGGAGAAGACCT
 TCTGCGTGAACGGCGGCGAGTGTTTTATGGTGAAGGACCTGTCTAATCCATCCAGAT
 ACCTGTGCAAGTGTCCCAACGAGTTCACAGGCGATCGCTGCCAGAATTACGTGATG
 GCCTCTTTTTATAAGGCTGAGGAGCTGTACCAGTAA (SEQ ID NO: 7).

Согласно одному варианту реализации изобретения, SEQ ID NO: 7 также называется "NPCFA". Согласно одному варианту реализации изобретения, SEQ ID NO: 7 содержит одну или более мутаций, которые кодируют одну или более мутаций в константном (Fc) участке mAb против Her3, предложенного в настоящем изобретении. Согласно одному варианту реализации изобретения, зрелое антитело против HER3 согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну мутацию в аминокислотах 234, 239, 434 или их комбинацию. Согласно другому варианту реализации изобретения, мутации аминокислот включают по меньшей мере одну из следующих мутаций по типу замены: L234F, S239A, N434A или их комбинацию.

Согласно одному варианту реализации изобретения, рекомбинантный слитый белок, предложенный в настоящем изобретении, содержит последовательность легкой цепи mAb против Her3. Согласно другому варианту реализации изобретения, последовательность легкой цепи кодируется последовательностью (SEQ ID NO: 8):

ATGGTGTTCAGACCCAGGTCTTCATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTGGTGCCTACG
 GGGACATCGAGATGACCCAGTCTCCAGATTCCTGGCCGTGAGCCTGGGAGAGAGG
 GCTACAATCAACTGCCGGTCCAGCCAGTCTGTGCTGTACTCTTCCAGCAACAGGAAT
 TACCTGGCCTGGTATCAGCAGAATCCCGGCCAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTATTGG
 GCTAGCACCAGAGAGTCTGGAGTGCCTGACCGCTTCTCTGGATCCGGAAGCGGCAC
 AGACTTCACCCTGACAATCTTCCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTATTG
 CCAGCAGTATTACTCTACCCCTAGGACATTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCA
 AGCGGACAGTGGCCGCTCCATCCGTGTTTCATCTTTCCACCCTCCGACGAGCAGCTGA
 AGTCCGGAACCGCTAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAATTCTACCCAAGAGAGGCC
 AAGGTGCAGTGAAGGTGGATAACGCTCTGCAGAGCGGCAATTCTCAGGAGTCCGT
 GACCGAGCAGGACAGCAAGGATTCTACATATTCCTGAGCTCTACCCTGACACTGTC
 CAAGGCCGATTACGAGAAGCACAAAGGTGTATGCTTGCAGAGGTGACCCATCAGGGCC
 TGTCAGCCCCGTGACAAAGAGCTTCAACCGCGGCGAGTGTTAA (SEQ ID NO: 8).

Согласно одному варианту реализации изобретения, SEQ ID NO: 8 также называется "PAL".

Согласно одному варианту реализации изобретения, тяжелая цепь антитела против HER3, содержащаяся в рекомбинантном белке слияния, предложенном в настоящем изобретении, содержит следующую аминокислотную последовательность:

MEFGLSWVFLVAIIKGVQCQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSFSGYYWSWIRQ
 PPGKLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRTISVETSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDK
 WTWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
 WNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV
 PKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGG
 GSGGGSSHLVKCAEKEKTFVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVM
 ASFYKAEELYQ (SEQ ID NO: 9).

Согласно одному варианту реализации изобретения, тяжелая цепь антитела против HER3, содержащаяся в рекомбинантном белке слияния, предложенном в настоящем изобретении, содержит следующую аминокислотную последовательность:

MEFGLSWVFLVAIIKGVQCQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSFSGYYW
 SWIRQPPGKLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRTISVETSKNQFSLKLSVTAADTAVYY
 CARDKWTWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
 PTVSVNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
 KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFLGGPAVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
 PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
 KGGGGSSHLVKCAEKEKTFVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNY
 YVMASFYKAEELYQ (SEQ ID NO: 10).

Согласно одному варианту реализации изобретения, последовательность тяжелой цепи mAb против Her3 содержит последовательность сигнального пептида. Согласно другому варианту реализации изобретения, последовательность сигнального пептида тяжелой цепи mAb против Her3 содержит аминокислотную последовательность MEFGLSWVFLVAIIKGVQC (SEQ ID NO: 11).

Согласно одному варианту реализации изобретения, легкая цепь антитела против HER3, содержащаяся в рекомбинантном белке слияния, содержит следующую аминокислотную последовательность:

MVLQTVFISLLLWISGAYGDIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRNYLA
 WYQQNPGQPPLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQYYYS
 TPRFTGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
 ALQSGNSQESVTEQDSKSTSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
 GEC (SEQ ID NO: 12).

Согласно одному варианту реализации изобретения, последовательность легкой цепи mAb против

Her3 содержит последовательность сигнального пептида. Согласно другому варианту реализации изобретения, последовательность сигнального пептида легкой цепи mAb против Her3 содержит аминокислотную последовательность MVLQTQVFISLLLWISGAYG (SEQ ID NO: 13).

Согласно одному варианту реализации изобретения, зрелый полипептид, такой как аминокислотная последовательность тяжелой цепи или легкой цепи антитела, описанная в настоящем изобретении, не содержит сигнального пептида.

Согласно одному варианту реализации изобретения, рекомбинантный слитый белок содержит следующие аминокислотные последовательности:

тяжелая цепь

QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCAVYGGFSFGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTN
 YNPSLKRVTISVETSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVS
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQS
 SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFLG
GPAVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHAHYTQKLSLSLSPGKGGGGSGGGSSHLVKAEKEK
 TFCVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKAEELYQ (SEQ

ID NO: 14,

где полужирным курсивным шрифтом обозначен линкер, а полужирным шрифтом обозначен фрагмент NRG-1); и

легкая цепь

DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIY
 WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIKRT
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 3).

Согласно одному варианту реализации изобретения, каждая из последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи в зрелом рекомбинантном белке слияния не содержит аминокислотной последовательности сигнального пептида.

Согласно конкретному варианту реализации изобретения, тяжелая цепь антитела против HER3, предложенного в настоящем изобретении, слита через С-концевую линкерную последовательность с изоформой NRG-1β2a, предложенной в настоящем изобретении. Согласно другому варианту реализации изобретения, С-конец тяжелой цепи антитела содержит Fc-домен антитела.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, предложены фармацевтические композиции, содержащие указанный рекомбинантный слитый белок, описанный в настоящем изобретении, содержащийся вместе с фармацевтическим носителем.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитело против HER3 и фрагмент NRG-1, описанный в настоящем изобретении, рекомбинантно или химически слиты/функционально связаны через линкер с образованием слитого белка. "Слитый белок", "слитый полипептид", "рекомбинантный слитый белок" или "рекомбинантный полипептид" относится к гибриднему полипептиду, который содержит части полипептида из по меньшей мере двух различных полипептидов. "Слитый белок", как определено в настоящем изобретении, представляет собой слияние, включающее первую аминокислотную последовательность (белок), содержащую, например, изоформу NRG-1β2a согласно изобретению, соединенную через линкер с С-концом второй аминокислотной последовательности, содержащей тяжелую цепь антитела, которое связывается специфично с ERBB3 (HER3).

Согласно одному варианту реализации изобретения, слитый белок кодируется и продуцируется рекомбинантным путем. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, рекомбинантный слитый белок кодируется последовательностью нуклеиновых кислот, кодирующей антитело согласно изобретению, которое функционально связано через последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую линкер, с последовательностью нуклеиновых кислот, кодирующей изоформу NRG-1β2a согласно изобретению.

Согласно одному варианту реализации изобретения, аминокислотная последовательность рекомбинантного слитого белка является гомологичной последовательности SEQ ID NO: 14, слитой с SEQ ID NO: 3. Термин "гомология" может относиться к идентичности последовательности рекомбинантного слитого белка (например, любой из SEQ ID NO: 1-18) более чем на 70%. Согласно другому варианту реализации изобретения, "гомология" относится к идентичности любой из SEQ ID NO: 1-18 более чем на 72%. Согласно другому варианту реализации изобретения, "гомология" относится к идентичности любой из SEQ ID NO: 1-18 более чем на 75%. Согласно другому варианту реализации изобретения, "гомология"

относится к идентичности любой из SEQ ID NO: 1-18 более чем на 78%. Согласно другому варианту реализации изобретения, "гомология" относится к идентичности любой из SEQ ID NO: 1-18 более чем на 80%. Согласно другому варианту реализации изобретения, "гомология" относится к идентичности любой из SEQ ID NO: 1-18 более чем на 82%. Согласно другому варианту реализации изобретения, "гомология" относится к идентичности любой из SEQ ID NO: 1-18 более чем на 83%. Согласно другому варианту реализации изобретения, "гомология" относится к идентичности любой из SEQ ID NO: 1-18 более чем на 85%. Согласно другому варианту реализации изобретения, "гомология" относится к идентичности любой из SEQ ID NO: 1-18 более чем на 87%. Согласно другому варианту реализации изобретения, "гомология" относится к идентичности любой из SEQ ID NO: 1-18 более чем на 88%. Согласно другому варианту реализации изобретения, "гомология" относится к идентичности любой из SEQ ID NO: 1-18 более чем на 90%. Согласно другому варианту реализации изобретения, "гомология" относится к идентичности любой из SEQ ID NO: 1-18 более чем на 92%. Согласно другому варианту реализации изобретения, "гомология" относится к идентичности любой из SEQ ID NO: 1-18 более чем на 93%. Согласно другому варианту реализации изобретения, "гомология" относится к идентичности любой из SEQ ID NO: 1-18 более чем на 95%. Согласно другому варианту реализации изобретения, "гомология" относится к идентичности любой из SEQ ID NO: 1-18 более чем на 96%. Согласно другому варианту реализации изобретения, "гомология" относится к идентичности любой из SEQ ID NO: 1-18 более чем на 97%. Согласно другому варианту реализации изобретения, "гомология" относится к идентичности любой из SEQ ID NO: 1-18 более чем на 98%. Согласно другому варианту реализации изобретения, "гомология" относится к идентичности любой из SEQ ID NO: 1-18 более чем на 99%. Согласно другому варианту реализации изобретения, "гомология" относится к идентичности любой из SEQ ID NO: 1-18 на 100%.

Определение процента идентичности между двумя последовательностями можно осуществлять с использованием математического алгоритма. Неограничивающий пример математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, представляет собой алгоритм из источника Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, модифицированный в соответствии с источником Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Такой алгоритм встроен в программы NBLAST и XBLAST согласно источнику Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410. Поиск нуклеотидов по BLAST можно осуществлять с помощью программы NBLAST (балл=100, длина слова=12) для получения нуклеотидной последовательности, гомологичной нуклеиновой кислоте, кодирующей интересующий белок. Белковый поиск BLAST можно осуществлять с помощью программы XBLAST (балл=50, длина слова=3) для получения аминокислотной последовательности, гомологичной интересующему белку. Для получения выравнивания с пропусками для сравнения последовательностей можно использовать Gapped BLAST, как описано в источнике Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Альтернативно, PSI-Blast можно использовать для осуществления итерационного поиска, который выявляет удаленные взаимодействия между молекулами (там же). При использовании программ BLAST, Gapped BLAST и PSI-BLAST можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). Другой неограничивающий пример математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, представляет собой алгоритм Myers and Miller, CABIOS (1989). Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программ выравнивания последовательностей GCG. При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей можно использовать таблицу весов остатков PAM 120, штраф за удлинение пробела, равный 12, и штраф за пробел, равный 4. Дополнительные алгоритмы для анализа последовательностей известны в данной области техники и включают ADVANCE и ADAM, описанные в источнике Torellis and Robotti, 1994, Comput. Appl. Biosci, 10:3-5; а также FASTA, описанный в источнике Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-8. В алгоритме FASTA ktpur представляет собой контрольную опцию, которая устанавливает чувствительность и скорость поиска. Если ktpur=2, подобные участки в двух последовательностях, которые сравнивают, находятся путем проверки пар выровненных оснований; если ktpur=1, то оцениваются отдельные выровненные аминокислоты, ktpur можно устанавливать на 2 или 1 для белковых последовательностей или от 1 до 6 для последовательностей ДНК. Если ktpur не установлен, значение по умолчанию составляет 2 для белков и 6 для ДНК. Альтернативно, выравнивание белковых последовательностей можно осуществлять с использованием алгоритма CLUSTAL W, как описано в источнике Higgins et al., 1996, Methods Enzymol. 266:383-402.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, полинуклеотиды согласно настоящему изобретению получают с помощью методов ПНР с использованием процедур и методов, известных специалисту в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, процедура включает лигирование двух различных последовательностей ДНК (см., например, "Current Protocols in Molecular Biology", eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992).

Согласно одному варианту реализации изобретения, полинуклеотиды согласно настоящему изобретению встраивают в векторы экспрессии (т.е. конструктор нуклеиновой кислоты) для обеспечения возможности экспрессии рекомбинантного полипептида. Согласно одному варианту реализации изобретения, вектор экспрессии согласно настоящему изобретению содержит дополнительные последовательности, которые делают указанный вектор подходящим для репликации и интеграции в клетках прокариот. Со-

гласно одному варианту реализации изобретения, вектор экспрессии согласно настоящему изобретению содержит дополнительные последовательности, которые делают этот вектор подходящим для репликации и интеграции в клетках эукариот. Согласно одному варианту реализации изобретения, вектор экспрессии согласно настоящему изобретению включает "челночный" вектор, который делает этот вектор подходящим для репликации и интеграции как в клетках прокариот, так и в клетках эукариот. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, векторы клонирования содержат последовательности инициации транскрипции и трансляции (например, промоторы, энхансер) и терминаторы транскрипции и трансляции (например, сигналы полиаденилирования).

Согласно одному варианту реализации изобретения, различные прокариотические и эукариотические клетки могут применяться в качестве систем экспрессии-хозяев для экспрессии полипептидов согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, указанные системы включают, но не ограничиваются указанными, микроорганизмы, такие как бактерии, трансформированные с помощью рекомбинантного вектора экспрессии на основе ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащего кодирующую полипептид последовательность; дрожжи, трансформированные рекомбинантными дрожжевыми векторами экспрессии, содержащими кодирующую полипептид последовательность.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, небактериальные системы экспрессии применяются (например, системы экспрессии млекопитающих, такие как клетки CHO) для экспрессии полипептида согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации изобретения, вектор экспрессии, используемый для экспрессии полинуклеотидов согласно настоящему изобретению в клетках млекопитающих, представляет собой вектор pCI-DHFR, содержащий промотор CMV и ген устойчивости к неомицину.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, в бактериальных системах согласно настоящему изобретению ряд векторов экспрессии можно предпочтительно выбрать в зависимости от предполагаемого применения для экспрессированного полипептида. Согласно одному варианту реализации изобретения, желательным является получение большого количества полипептида. Согласно одному варианту реализации изобретения, желательными являются векторы, которые направляют экспрессию белкового продукта на высоком уровне, возможно, в виде слияние с гидрофобной сигнальной последовательностью, которая направляет экспрессированный продукт в периплазму бактерий или культуральную среду, из которой белковый продукт легко очистить. Согласно одному варианту реализации изобретения, конкретный слитый белок сконструирован со специфичным сайтом расщепления, облегчающим восстановление полипептида. Согласно одному варианту реализации изобретения, векторы, адаптируемые к такой манипуляции, включают, но не ограничиваются указанными, группу векторов экспрессии pET E. coli [Studier et al., *Methods in Enzymol.* 185:60-89(1990)].

Согласно одному варианту реализации изобретения, применяются дрожжевые системы экспрессии. Согласно одному варианту реализации изобретения, ряд векторов, содержащих конститутивные или индуцибельные промоторы, может применяться на дрожжах, как описано в патенте США № 5 932 447. Согласно другому варианту реализации изобретения, используются векторы, которые способствуют интеграции чужеродных последовательностей ДНК в хромосому дрожжей.

Согласно одному варианту реализации изобретения, векторы экспрессии согласно настоящему изобретению также могут включать дополнительные полинуклеотидные последовательности, которые позволяют, например, трансляцию некоторых белков из одной мРНК, такой как внутренний участок посадки рибосомы (IRES) и последовательности для геномной интеграции комплекса промотор-химерный полипептид.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, векторы экспрессии согласно настоящему изобретению содержат элементы, которые повышают экспрессию рекомбинантных слитых белков согласно изобретению. Такие признаки включают, но не ограничиваются указанными, выбор промотора и полиаденилирование. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста (БГР). Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, промотор включает конститутивно активный промотор. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, промотор включает промотор цитомегаловируса (pCMV).

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, векторы экспрессии млекопитающих включают, но не ограничиваются указанными, pcDNA3, pcDNA3,1(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3,1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, которые доступны из компании Invitrogen, pCI, который доступен из компании Promega, pMbac, pPbac, pBK-RSV и pBK-CMV, которые доступны из компании Stratagene, pTRES, который доступен из компании Clontech, и другие производные.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, векторы экспрессии, содержащие регуляторные элементы из вирусов эукариот, таких как ретровирусы, применяются согласно настоящему изобретению. Векторы SV40 включают pSVT7 и pMT2. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, векторы, происходящие из бычьего вируса папилломы включают pBV-1MTHA, и векторы, проис-

ходящие из вируса Эпштейна-Барра, включают рНЕВО и р205. Другие примеры векторов включают рMSG, рAV009/A⁺, рМТО10/A⁺, рМАМneo-5, бакуловирус рDSVE и любой другой вектор, позволяющий экспрессию белков под контролем раннего промотора SV-40, позднего промотора SV-40, промотора металлотионеина, промотора мышинного вируса опухоли молочной железы, промотора вируса саркомы Рауса, промотора полигедрина или других промоторов, которые, как было показано, являются эффективными для экспрессии в клетках эукариот.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, рекомбинантные вирусные векторы применимы для экспрессии полипептидов согласно настоящему изобретению *in vivo*, поскольку они предоставляют преимущества, такие как латеральная инфекция и специфичность нацеливания. Согласно одному варианту реализации изобретения, латеральная инфекция является характерной для жизненного цикла, например, ретровируса и представляет собой процесс, с помощью которого одна инфицированная клетка производит много потомственных вирионов, которые отпочковываются и инфицируют соседние клетки. Согласно одному варианту реализации изобретения, в результате происходит быстрое инфицирование значительной площади, большая часть которой изначально не была инфицирована исходными вирусными частицами. Согласно одному варианту реализации изобретения, производят вирусные векторы, которые не способны распространяться латерально. Согласно одному варианту реализации изобретения, эта характеристика может быть полезной, если желаемой целью является введение конкретного гена только в ограниченное количество клеток-мишеней.

Согласно одному варианту реализации изобретения, различные способы могут использоваться для введения вектора экспрессии, кодирующего рекомбинантный слитый белок согласно настоящему изобретению в клетки. Такие способы в целом описаны в источниках Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992); Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., *Somatic Gene Therapy*, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., *Gene Targeting*, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworths, Boston Mass. (1988), и Gilboa et al. [*Biotechniques* 4 (6): 504-512, 1986] и включают, например, стабильную или временную трансфекцию, липофекцию, электропорацию и инфицирование с помощью рекомбинантных вирусных векторов. Кроме того, методов положительной-отрицательной селекции можно найти в патентах США № 5 464 764 и 5 487 992.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, введение нуклеиновой кислоты путем вирусной инфекции предоставляет несколько преимуществ по сравнению с другими способами, такими как липофекция и электропорация, поскольку дают возможность достижения более высокой эффективности трансфекции из-за инфекционной природы вирусов.

Согласно одному варианту реализации изобретения, следует понимать, что полипептиды согласно настоящему изобретению также можно экспрессировать из конструкта нуклеиновой кислоты, вводимого в организм индивида с использованием любого подходящего способа введения, описанного в настоящем изобретении выше (т.е. путем генной терапии *in vivo*). Согласно одному варианту реализации изобретения, конструкт нуклеиновой кислоты вводят в подходящую клетку с помощью соответствующего носителя/способа генной доставки (трансфекции, трансдукции, гомологичной рекомбинации и т.д.) и при необходимости системы экспрессии и затем модифицированные клетки размножают в культуре и возвращают в организм индивида (т.е. генная терапия *ex vivo*).

Очевидно, что помимо необходимых элементов для транскрипции и трансляции встраиваемой кодирующей последовательности (кодирующей полипептид) конструкт экспрессии согласно настоящему изобретению также может содержать последовательности, сконструированные для оптимизации стабильности, продукции, очистки, выхода или активности экспрессируемого полипептида.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, трансформированные клетки культивируют при эффективных условиях, которые позволяют экспрессию больших количеств рекомбинантного слитого белка или полипептида. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, эффективные условия культивирования включают, но не ограничиваются указанными, эффективную среду, биореактор, температуру, значение pH и условия содержания кислорода, которые позволяют продукцию белка. Согласно одному варианту реализации изобретения, эффективная среда относится к любой среде, в которой клетку культивируют для получения рекомбинантного полипептида согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, среда, как правило, содержит водный раствор, содержащий источники усвояемого углерода, азота и фосфата, и подходящие соли, минералы, металлы и другие питательные вещества, такие как витамины. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, клетки согласно настоящему изобретению можно культивировать в удобных ферментационных биореакторах, встряхиваемых колбах, пробирках, микротирационной посуде и чашках Петри. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, культивирование осуществляют при температуре, значении pH и содержании кислорода, подходящем для рекомбинантной клетки. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, условия культивирования находятся в пределах знаний специалиста в данной области техники.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, в зависимости от вектора и системы-

хозяина, используемой для продукции, полученные в результате полипептиды согласно настоящему изобретению сохраняются в рекомбинантной клетке, секреторируются в ферментационную среду, секреторируются в пространство между двумя клеточными мембранами, такое как периплазматическое пространство *E. coli*, или удерживаются на внешней поверхности клеточной или вирусной мембраны.

Согласно одному варианту реализации изобретения, после заранее определенного времени культивирования осуществляют восстановление рекомбинантного полипептида.

Согласно одному варианту реализации изобретения, фраза "восстановление рекомбинантного полипептида" при использовании в настоящем изобретении относится к сбору всей ферментационной среды, содержащей полипептид без необходимости предполагаемых дополнительных этапов разделения или очистки.

Согласно одному варианту реализации изобретения, полипептиды согласно настоящему изобретению очищают с использованием различных стандартных методов белковой очистки, включая, но не ограничиваясь указанными, аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию, фильтрацию, электрофорез, хроматографию гидрофобных взаимодействий, гель-фильтрационную хроматографию, обращенно-фазовую хроматографию, хроматографию на основе конканавалина А, хроматофокусирование и дифференциальную солубилизацию.

Согласно одному варианту реализации изобретения, для облегчения восстановлению может быть сконструирована экспрессируемая кодирующая последовательность, кодирующая полипептид согласно настоящему изобретению и слитый отщепляемый фрагмент. Согласно одному варианту реализации изобретения, слитый белок может быть сконструирован таким образом, что полипептид можно легко выделять с помощью аффинной хроматографии; например, путем иммобилизации на колонке, специфичной для отщепляемого фрагмента. Согласно одному варианту реализации изобретения, между полипептидом и отщепляемым фрагментом создают сайт расщепления, и полипептид может быть высвобожден из хроматографической колонки путем обработки соответствующим ферментом или агентом, который специфично отщепляет слитый белок по этому сайту [например, см. Booth et al., *Immunol. Lett.* 19:65-70 (1988); и Gardella et al., *J. Biol. Chem.* 265:15854-15859 (1990)].

Согласно одному варианту реализации изобретения, полипептид согласно настоящему изобретению извлекают в "по существу чистой" форме.

Согласно одному варианту реализации изобретения, фраза "по существу чистый" относится к чистоте, которая позволяет эффективное использование белка в соответствии со способами применения, описанными в настоящем изобретении.

Согласно одному варианту реализации изобретения, полипептид согласно настоящему изобретению также можно синтезировать с использованием систем экспрессии *in vitro*. Согласно одному варианту реализации изобретения, способы синтеза *in vitro* хорошо известны в данной области техники, и компоненты системы являются коммерчески доступными.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, рекомбинантные полипептиды синтезируют и очищают; их терапевтическую эффективность можно проанализировать *in vivo* или *in vitro*.

Согласно одному варианту реализации изобретения, фармацевтическая композиция, предложенная в настоящем изобретении, содержащая указанный рекомбинантный слитый белок согласно изобретению, дополнительно содержит фармацевтический носитель. При использовании в настоящем изобретении, "фармацевтический носитель" включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты задержки абсорбции и подобные агенты, которые являются физиологически совместимыми. Предпочтительно, носитель является подходящим для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинномозгового или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии).

Способы терапевтического применения.

Согласно одному варианту реализации изобретения, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного слитого белка или фармацевтической композиции, содержащей указанный рекомбинантный слитый белок, описанный в настоящем изобретении.

Согласно одному варианту реализации изобретения, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения сердечно-сосудистого заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного слитого белка или содержащей его фармацевтической композиции.

Согласно одному варианту реализации изобретения, настоящее изобретение обеспечивает способ предотвращения, ингибирования, подавления или задержки начала развития сердечно-сосудистого заболевания или состояния у субъекта, включающий введение эффективного количества рекомбинантного слитого белка или фармацевтической композиции, описанной в настоящем изобретении.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, сердечнососудистое заболевание включает хроническую сердечную недостаточность/застойную сердечную недостаточность (ЗСН), острую сердечную недостаточность/инфаркт миокарда (ИМ), систолическую дисфункцию левого желудочка, реперфузионное повреждение, связанное с ИМ, вызванную химиотерапией кардиотоксичность (у взросло-

го или ребенка), вызванную радиацией кардиотоксичность, в также лечение в дополнение к хирургическому вмешательству при врожденном заболевании сердца у детей.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, вызванная химиотерапией кардиотоксичность является результатом получения субъектом антрациклинов, алкилирующих агентов, антимикротубулиновых агентов и антиметаболитных агентов, используемых в качестве химиотерапии.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, сердечнососудистое состояние представляет собой кардиотоксичность в результате получения субъектом противораковой терапии. Согласно другим вариантам реализации изобретения, противораковая терапия представляет собой направленную против HER-2 терапию. Согласно другим вариантам реализации изобретения, направленная против HER-2 терапия включает применение трастузумаба, адо-трастузумаба эмтанзина, лапатиниба, нератиниба и пертузумаба, любого антитела против HER2, любого агента против HER2 или их комбинации.

Согласно другому аспекту, изобретение относится к способу индукции ремоделирования саркомерных и цитоскелетных структур мышечных клеток или межклеточных адгезионных контактов, включающему обработку клеток рекомбинантным белком слияния, описанным в настоящем изобретении.

Согласно одному варианту реализации изобретения, терапевтический способ направлен на лечение сердечной недостаточности, являющейся результатом диссоциации адгезионных контактов между клетками сердечной мышцы и/или дезорганизации саркомерных структур клеток млекопитающего.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение обеспечивает способ предотвращения, лечения или задержки сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса у человека, включающему введение фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантный слитый белок, описанный в настоящем изобретении.

При использовании в настоящем изобретении, термин "фракция выброса" относится к измерению фракции выброса (EF), выраженной, как правило, в виде процентного количества крови, выкачиваемой левым желудочком при каждом сокращении. Например, фракция выброса, составляющая 50 процентов, означает, что 50 процентов общего количества крови в левом желудочке выталкивается при каждом ударе сердца.

Изобретение направлено на лечение субъектов, страдающих или находящихся в группе риска развития сердечного заболевания и связанных состояний, например, сердечной недостаточности.

Термин "сердечная недостаточность" означает нарушение сердечной функции, при которой сердце не накачивает кровь со скоростью, необходимой для потребностей метаболизирующих тканей. Сердечная недостаточность включает широкий диапазон заболеваний, таких как застойная сердечная недостаточность, инфаркт миокарда, тахикардия, семейная гипертрофическая кардиомиопатия, ишемическая болезнь сердца, идиопатическая дилатационная кардиомиопатия и миокардит. Сердечная недостаточность может быть вызвана любым количеством факторов, включая ишемическую, врожденную, ревматоидную или идиопатическую формы. Хроническая гипертрофия сердца представляет собой значимое заболевание, которое является предшественником застойной сердечной недостаточности и остановки сердца.

Согласно одному варианту реализации изобретения, "лечение" относится как к терапевтическому лечению, так и профилактическим или превентивным мерам, целью которых является предотвращение или замедление (снижение) гипертрофии сердца. Нуждающиеся в лечении субъекты включают субъектов, страдающих расстройством, а также субъектов, предрасположенных к указанному расстройству, или субъектов, у которых предполагается предотвратить указанное расстройство. Гипертрофия сердца может представлять собой гипертрофию, отвечающую на ретиноевую кислоту и возникающую из-за любой причины, включая врожденный, вирусный, идиопатический, кардиотрофический или миотрофический фактор, или гипертрофию, вызванную ишемией или ишемическими инсультами, например, инфарктом миокарда. Как правило, лечение осуществляют для остановки или замедления прогрессирования гипертрофии, в частности, после случившегося повреждения сердца, такого как повреждение в результате ишемии. Предпочтительно, для лечения инфарктов миокарда фармацевтические композиции, предложенные в настоящем изобретении, вводят сразу после инфаркта миокарда для предотвращения или уменьшения гипертрофии.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, лечение субъекта фармацевтической композицией, содержащей рекомбинантный слитый белок, предложенный в настоящем изобретении, может приводить к повышению среднего времени выживаемости в популяции подверженных лечению субъектов по сравнению с популяцией, получающей монотерапию лекарственным средством, которое не представляет собой соединение согласно изобретению или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, аналог или производное. Предпочтительно, после лечения с помощью стратегий, лечебных приемов, способов, комбинаций и композиций, предложенных в настоящем изобретении, среднее время выживаемости повышается более чем на 30 дней; более предпочтительно, более чем 60 дней; более предпочтительно, более чем 90, 120, или 365 дней; более предпочтительно, более чем 365 дней. Повышение среднего времени выживаемости в популяции можно измерить с помощью любого воспроизводимого способа. Повышение среднего времени выживаемости в популяции можно измерить, например, путем расчета для популяции средней продолжительности выживаемости после начала лечения активным соединением.

Повышение среднего времени выживаемости в популяции можно также измерить, например, путем расчета для популяции средней продолжительности выживаемости после завершения первого цикла лечения фармацевтической композицией, описанной в настоящем изобретении.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, лечение субъекта с помощью фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантный слитый белок, предложенный в настоящем изобретении, может приводить к снижению коэффициента смертности в популяции подверженных лечению субъектов по сравнению с популяцией, получающей отдельно носитель. Лечение рака может приводить к снижению коэффициента смертности в популяции подверженных лечению субъектов по сравнению с не подверженной лечению популяцией. Лечение рака может приводить к снижению коэффициента смертности в популяции подверженных лечению субъектов по сравнению с популяцией, получавшей монотерапию с помощью лекарственного средства, которое не представляет собой соединение согласно изобретению или его фармацевтически приемлемую соль, сольват, аналог или производное. Предпочтительно после лечения с помощью стратегий, лечебных приемов, способов, комбинаций и композиций, предложенных в настоящем изобретении, коэффициент смертности снижается более чем на 2%; более предпочтительно, более чем на 5%; более предпочтительно, более чем на 10%; и наиболее предпочтительно, более чем на 25%. Снижение коэффициента смертности популяции подверженных лечению субъектов можно измерить с помощью любого воспроизводимого способа. Снижение коэффициента смертности в популяции можно измерить, например, путем расчета в популяции среднего количества связанных с заболеванием смертей на единицу времени после начала лечения активным соединением. Снижение коэффициента смертности популяции также можно измерить, например, путем расчета для популяции среднего количества связанных с заболеванием смертей на единицу времени после завершения первого цикла лечения с помощью фармацевтической композиции, описанной в настоящем изобретении.

Согласно одному варианту реализации, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения связанного с центральной нервной системой (ЦНС) заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного слитого белка или фармацевтической композиции, описанной в настоящем изобретении.

Согласно одному варианту реализации изобретения, настоящее изобретение обеспечивает способ предотвращения, ингибирования, подавления или задержки начала развития связанного с ЦНС заболевания или состояния у субъекта, включающий введение эффективного количества рекомбинантного слитого белка или фармацевтической композиции, описанной в настоящем изобретении.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, связанное с ЦНС заболевание или состояние представляет собой амиотрофический боковой склероз (АБС), болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, паралич Белла, эпилепсию и эпилептические припадки, синдром Гийена-Барре, инсульт, травматическое повреждение мозга, множественный склероз или их комбинацию.

Введение, дозирование.

Композицию согласно настоящему изобретению можно вводить нуждающемуся в этом субъекту парентерально или с помощью различных способов, известных в данной области техники. Как очевидно специалисту в данной области техники, путь и/или способ введения будет варьировать в зависимости от желаемых результатов. Для введения соединения согласно изобретению с помощью конкретных путей введения может быть необходимо покрывать соединение или вводить соединение совместно с материалом для предотвращения его инактивации. Например, соединение можно вводить субъекту в подходящем носителе, например, липосомах, или разбавителе. Фармацевтически приемлемые разбавители включают солевые растворы и водные буферные растворы. Фармацевтические носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстемпорального приготовления стерильных растворов для инъекций или дисперсии. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области техники.

Согласно типичным вариантам реализации изобретения, препараты для введения субъектам включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии, и эмульсии. Некоторые варианты реализации изобретения включают неводные растворители, такие как пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла (например, оливковые масла), органические сложные эфиры (например, этилолеат) и другие растворители, известные специалистам в данной области техники. Физиологически приемлемые носители (или вспомогательные вещества) необязательно применяются согласно конкретным вариантам реализации изобретения. Примеры таких носителей включают, например, солевой раствор, ФСБ, раствор Рингера, лактированный раствор Рингера и т.д. Дополнительно консерванты и добавки необязательно добавляют к композициям для обеспечения стабильности и стерильности. Например, антибиотики и другие бактерицидные средства, антиоксиданты, хелатирующие агенты и т.п. необязательно присутствуют в различных вариантах реализации композиций в настоящем изобретении.

Фразы "парентеральное введение" и "введенный парентерально" при использовании в настоящем изобретении означают способы введения, отличные от кишечного и местного введения, как правило, способы введения путем инъекции, и включают, но не ограничиваются указанными, внутривенные, внутримышечные, интраартериальные, интратекальные, интракапсулярные, интраорбитальные, интракардиальные, внутрикожные, внутрибрюшинные, транстрахеальные, подкожные, субкутикулярные,

внутрисуставные, субкапсулярные, субарахноидальные, внутриспинномозговые, эпидуральные и интратеральные инъекции и инфузии.

Независимо от выбранного пути введения, соединения согласно настоящему изобретению, которые можно применять в подходящей гидратированной форме, и/или фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению, представлены в виде фармацевтически приемлемых форм дозирования, полученных с помощью стандартных методов, известных специалистам в данной области техники.

Рекомбинантный слитый белок или содержащую его фармацевтическую композицию необязательно вводят субъектам, нуждающимся в лечении (либо терапевтическом, либо профилактическом) в любом подходящем стерильном фармацевтическом носителе. Такой фармацевтический носитель способствует поддержанию растворимости и действия слитого белка. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, может быть желательным вводить дополнительные компоненты вместе с белком слияния. Например, согласно некоторым схемам лечения, химиотерапевтические агенты, антибиотики, дополнительные лекарственные формы, содержащие указанный рекомбинантный слитый белок согласно изобретению и один или более стандартных лечебных агентов и т.д. необязательно включены в композиции согласно изобретению.

При использовании в настоящем изобретении термины "комбинированное лечение", "комбинированная терапия" и "совместная терапия" используются взаимозаменяемо и в целом относятся к лечебным приемам с применением рекомбинантного слитого белка или содержащей его фармацевтической композиции, как предложено в настоящем изобретении, и дополнительного терапевтического агента. Как правило, приемы комбинированного лечения являются частью специфического режима лечения, направленного на обеспечение благоприятного эффекта от одновременного действия комбинации терапевтических агентов. Благоприятный эффект комбинации может включать, но не ограничивается указанными, фармакокинетическое или фармакодинамическое содействие, являющееся результатом комбинированного действия терапевтических агентов. Введение указанных терапевтических агентов в комбинации, как правило, осуществляют в течение определенного периода времени (обычно минут, часов, дней или недель в зависимости от выбранной комбинации). Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, комбинированное лечение включает введения двух или более терапевтических агентов последовательно, где каждый терапевтический агент вводят в разное время, а также введение указанных терапевтических агентов или по меньшей мере двух из терапевтических агентов по существу одновременно. По существу одновременное введение можно осуществлять, например, путем введения субъекту одной формы дозирования, содержащей фиксированные соотношения каждого терапевтического агента, или в нескольких отдельных формах дозирования для разных терапевтических агентов. Последовательное или по существу одновременное введение каждого терапевтического агента можно осуществлять с помощью любого подходящего способа, включая, но не ограничиваясь указанными, пероральные путем введения, внутривенные пути введения, внутримышечные пути введения и прямую абсорбцию через ткани со слизистой оболочкой. Терапевтические агенты можно вводить одним и тем же путем или разными путями. Терапевтические агенты можно вводить с одинаковым или разным интервалом введения. Например, первый выбранный терапевтический агент комбинации можно вводить с помощью внутривенной инъекции, тогда как другие терапевтические агенты комбинации можно вводить перорально. Альтернативно, например, все терапевтические агенты можно вводить перорально или все терапевтические агенты можно вводить путем внутривенной инъекции.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, комбинированная терапия также включает введение терапевтических агентов, как описано выше, дополнительно в комбинации с другими биологически активными ингредиентами и нелекарственными способами лечения (например, хирургическим или радиационным лечением). Когда комбинированная терапия дополнительно включает нелекарственное лечение, указанное нелекарственное лечение можно осуществлять в любое подходящее время, при условии что достигается благоприятный эффект от совместного действия комбинации терапевтических агентов и нелекарственного лечения. Например, в подходящих случаях благоприятный эффект все еще наблюдается при временном прекращении нелекарственного лечения, сопровождающего введение терапевтических агентов, возможно, на дни или даже недели.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, дополнительный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент (также называемый антинеопластическим агентом или антипролиферативным агентом), например, алкилирующий агент; антибиотик; антиметаболит; детоксирующий агент; интерферон; поликлональное или моноклональное антитело; ингибитор EGFR; ингибитор HER2; ингибитор гистон-деацетилазы; гормон; ингибитор митоза; ингибитор mTOR; мультикиназный ингибитор; ингибитор серин/треонинкиназы; ингибиторы тирозинкиназ; ингибитор VEGF/VEGFR; таксан или производное таксана, ингибитор ароматазы, антрациклин, лекарственное средство, направленное на микротрубочки, яд топоизомеразы, ингибитор молекулярной мишени или фермента (например, киназы или протеинметилтрансферазы), лекарственное средство, представляющее собой аналог цитидина или любое химиотерапевтическое вещество, ингибитор иммунных контрольных точек, антинеопластический агент на основе платины, ингибитор CDK, ингибитор PARP или любой антинеопластический или антипролиферативный агент, известный специалистам в данной области техники.

Примеры алкилирующих агентов, подходящих для применения согласно комбинированным лечебным приемам, предложенным в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются указанными, циклофосфамид (Cytoxan; Neosar); хлорамбуцил (Leukeran); мелфалан (Alkeran); кармустин (BiCNU); бусульфан (Busulfex); ломустин (CeeNU); дакарбазин (DTIC-Dome); оксалиплатин (Eloxatin); кармустин (Gliadel); ифосфамид (Ifex); мехлоретамин (Mustargen); бусульфан (Myleran); кароплатин (Paraplatin); цисплатин (CDDP; Platinol); темозоломид (Temodar); тиотепа (Thioplex); бендамустин (Treanda) или стрептозоцин (Zanosar).

Примеры подходящих антрациклинов включают, но не ограничиваются указанными, доксорубин (Адриамицин); липосомный доксорубин (Doxil); митоксатрон (Novantrone); блеомицин (Blenoxane); даунорубин (Cerubidine); липосомный даунорубин (DaunoXome); дактиномицин (Cosmegen); эпирубицин (Ellence); идарубин (Idamycin); пликамицин (Mithracin); митомицин (Mutamycin); пентостатин (Nipent) или валрубицин (Valstar).

Примеры антиметаболитов включают, но не ограничиваются указанными, фторурацил (Adrucil); капецитабин (Xeloda); гидроксимочевину (Hydrea); меркаптопурин (Purinethol); пеметрексед (Alimta); флударабин (Fludara); неларабин (Arganon); кладрибин (Cladribine Novaплюс); клофарабин (Clolar); цитарабин (Cytosar-U); децитабин (Dacogen); липосомный цитарабин (DepoCyt); гидроксимочевину (Droxia); пралатрексат (Folotyn); флоксуридин (FUDR); гемцитабин (Gemzar); кладрибин (Leustatin); флударабин (Oforta); метотрексат (MTX; Rheumatrex); метотрексат (Trexall); тиогуанин (Tabloid); TS-1 или цитарабин (Tarabine PFS).

Примеры детоксирующих агентов включают, но не ограничиваются указанными, амифостин (Ethyol) или месну (Mesnex).

Примеры интерферонов включают, но не ограничиваются указанными, интерферональфа-2b (Intron A) или интерферон альфа-2a (Roferon-A).

Примеры поликлональных или моноклональных антител включают, но не ограничиваются указанными, трастузумаб (Herceptin); офатумумаб (Arzerra); бевацизумаб (Avastin); ритуксимаб (Rituxan); цетуксимаб (Erbix); панитумумаб (Vectibix); тозитумумаб/йод-131-тозитумумаб (Bexxar); алемтузумаб (Campath); ибритумумаб (Zevalin; In-111; Y-90 Zevalin); гемтузумаб (Mylotarg); экулизумаб (Soliris) или денозумаб.

Примеры ингибиторов EGFR включают, но не ограничиваются указанными, гефитиниб (Iressa); лапатиниб (Tykerb); цетуксимаб (Erbix); эрлотиниб (Tarceva); панитумумаб (Vectibix); PKI-166; канертиниб (CI-1033); матузумаб (EMD 72000) или ЕКВ-569.

Примеры ингибиторов HER2 включают, но не ограничиваются указанными, трастузумаб (Herceptin); лапатиниб (Tykerb) или АС-480.

Ингибиторы гистон-деацетилазы включают, но не ограничиваются указанным, вориностаб (Zolinza).

Примеры гормонов включают, но не ограничиваются указанными, тамоксифен (Soltamox; Nolvadex); ралоксифен (Evista); мегестрол (Megace); лейпролид (Lupron; Lupron Depot; Eligard; Viadur); фульвестрант (Faslodex); летрозол (Femara); трипторелин (Trelstar LA; Trelstar Depot); экземесатн (Aromasin); гозерелин (Zoladex); бикалутамид (Casodex); анастрозол (Arimidex); флуоксиместерон (Androxu; Halotestin); медроксипрогестерон (Provera; Depo-Provera); экстрамустин (Emcyt); флутамид (Eulexin); торемифен (Fareston); дегареликс (Firmagon); нилутамид (Nilandron); абареликс (Plenaxis) или тестолактон (Teslac).

Примеры ингибиторов митоза включают, но не ограничиваются указанными, паклитаксел (Taxol; Onxol; Abрахane); доцетаксел (Taxotere); винкристин (Oncovin; Vincasar PFS); винбластин (Velban); этопозид (Торосар; Etopophos; VePesid); тенипозид (Vumon); иксаебпилон (Ixemptra); нокодазол; эпотилон; винорельбин (Navelbine); камптотецин (СРТ); иринотекан (Campotar); топотекан (Nусамтин); амсакрин или ламелларин D (LAM-D).

Примеры ингибиторов МТОR включают, но не ограничиваются указанными, эверолимус (Afinitor) или темзиролимус (Torisel); рапамун, рифафоролимус или AP23573.

Примеры мультикиназных ингибиторов включают, но не ограничиваются указанными, сорефениб (Nexavar); сунитиниб (Sutent); BIBW 2992; E7080; Zd6474; PKC-412; мотезаниб или AP24534.

Примеры ингибиторов серин/треонинкиназы включают, но не ограничиваются указанными, рубоксистаурин; эрил/фазудил гидрохлорид; флавопиридол; селициклиб (CYC202; Roscovitine); SNS-032 (BMS-387032); Pkc412; бриостатин; KAI-9803; SF1126; VX-680; Azd1152; Arry-142886 (AZD-6244); SCIO-469; GW681323; CC-401; CEP-1347 или PD 332991.

Примеры ингибиторов тирозинкиназы включают, но не ограничиваются указанными, эрлотиниб (Tarceva); гефитиниб (Iressa); иматиниб (Gleevec); сорафениб (Nexavar); сунитиниб (Sutent); трастузумаб (Herceptin); бевацизумаб (Avastin); ритуксимаб (Rituxan); лапатиниба (Tykerb); цетуксимаб (Erbix); панитумумаб (Vectibix); эверолимус (Afinitor); алемтузумаб (Campath); гемтузумаб (Mylotarg); темсиролимус (Torisel); пазопаниб (Votrient); дазатиниб (Sprycel); нилотиниб (Tasigna); ваталаниб (Ptk787; ZK222584); CEP-701; SU5614; MLN518; XL999; VX-322; Azd0530; BMS-354825; SKI-606 CP-690; AG-490; WHI-P154; WHI-P131; AC-220 или AMG888.

Примеры ингибиторов VEGF/VEGFR включают, но не ограничиваются указанными, бевацизумаб

(Avastin), сарафениб (Nexavar), сунитиниб (Sutent), ранибизумаб, пегаптаниб или вандетиниб.

Примеры направленных на микротрубочки лекарственных средств включают, но не ограничиваются указанными, паклитаксел, доцетаксел, винкристин, винбластин, нокодазол, эпотилоны и навелбин.

Примеры ядов топоизомеразы включают, но не ограничиваются указанными, тенипозид, этопозид, адриамицин, камптотецин, даунорубицин, дактиномицин, митоксантрон, амсакрин, эпирубицин и идарубицин.

Примеры таксанов или производных таксанов включают, но не ограничиваются указанными, паклитаксел и доцетаксел.

Примеры ингибиторов иммунных контрольных точек включают ингибиторы белка программированной клеточной гибели 1 (PD-1), молекулы CD274 (PD-L1) и связанного с цитотоксическими Т-лимфоцитами белка 4 (CTLA4). Примеры ингибиторов PD-1 включают пембролизумаб, ниволумаб и цемиплимаб. Примеры ингибиторов PD-L1 включают атезолизумаб, авелумаб и дурвалумаб. Примеры ингибиторов CTLA4 включают ипилимумаб.

Примеры антинеопластических агентов на основе платины включают цисплатин и карбоплатин.

Примеры ингибиторов циклин-зависимой киназы (CDK) включают абемациклиб, пальбоциклиб и рибоциклиб.

Примеры ингибиторов поли(АДФ-рибоза)полимеразы (PARP) включают талозопариб, олапариб, рукапариб, нирапариб и велипариб.

Примеры общих химиотерапевтических, антинеопластических, антипролиферативных агентов включают, но не ограничиваются указанными, альтретамин (Hexalen); изотретиноин (Accutane; Amnesteem; Claravis; Sotret); третиноин (Vesanoid); азациитидин (Vidaza); бортезомиб (Velcade) аспарагиназу (Elspar); левамизол (Ergamisol); митотан (Lysodren); прокарбазин (Matulane); пегаспардаз (Oncaspar); денилейкин дифтитокс (Ontak); порфимер (Photofrin); альдеслейкин (Proleukin); леналидомид (Revlimid); бексаротен (Targretin); талидомид (Thalomid); темсиролимус (Togisel); триоксид мышьяка (Trisenox); вертепорфин (Visudyne); мимозин (Leucenol); (1M тегафур - 0,4 M 5-хлор-2,4-дигидроксипиримидин - 1 M оксонат калия) или ловастатин.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, предложены приемы комбинированного лечения, в которых дополнительный терапевтический агент представляет собой цитокин, например, G-CSF (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор). Согласно другому аспекту, фармацевтическую композицию, предложенную в настоящем изобретении, можно вводить в комбинации с лучевой терапией. Лучевую терапию также можно проводить в комбинации с фармацевтической композицией, предложенной в настоящем изобретении, и другим химиотерапевтическим агентом, описанным в настоящем изобретении, как часть многокомпонентной терапии. Согласно другому аспекту, фармацевтическую композицию, предложенную в настоящем изобретении, можно вводить в комбинации со стандартными химиотерапевтическими комбинациями, включая, но не ограничиваясь указанными, CMF (циклофосфамид, метотрексат и 5-фторурацил), CAF (циклофосфамид, адриамицин и 5-фторурацил), AC (адриамицин и циклофосфамид), FEC (5-фторурацил, эпирубицин и циклофосфамид), АСТ или АТС (адриамицин, циклофосфамид и паклитаксел), ритуксимаб, кселода (капецитабин), цисплатин (CDDP), карбоплатин, TS-1 (тегафур, гиместат и отастат калия в молярном отношении 1:0,4:1), камптотецин-11 (CPT-11, иринотекан или Camptosar™), CHOP (циклофосфамид, гидроксидаунорубицин, онковин и преднизон или преднизолон), R-CHOP (ритуксимаб, циклофосфамид, гидроксидаунорубицин, онковин, преднизон или преднизолон) или CMFP (циклофосфамид, метотрексат, 5-фторурацил и преднизон).

Согласно некоторым предпочтительным вариантам реализации изобретения, фармацевтическую композицию, предложенную в настоящем изобретении, можно вводить с ингибитором фермента, такого как рецепторная или нерцепторная киназа. Рецепторные и нерцепторные киназы представляют собой, например, тирозинкиназы или серин/треонинкиназы. Ингибиторы киназ, описанные в настоящем изобретении, представляют собой малые молекулы, полинуклеиновые кислоты, полипептиды или антитела.

Примеры ингибиторов киназ включают, но не ограничиваются указанными, бевацизумаб (направлен на VEGF), BIBW 2992 (направлен на EGFR и Erb2), цетуксимаб/эрбитукс (направлен на Erb1), иматиниб/гливек (направлен на Bcr-Abl), трастузумаб (направлен на Erb2), гефитиниб/иресса (направлен на EGFR), ранибизумаб (направлен на VEGF), пегаптаниб (направлен на VEGF), эрлотиниб/тарцева (направлен на Erb1), nilотиниб (направлен на Bcr-Abl), лапатиниб (направлен на Erb1 и Erb2/Her2), GW-572016/лапатиниба дитозилат (направлен на HER2/Erb2), панитумумаб/вектибикс (направлен на EGFR), вандетиниб (направлен на RET/VEGFR), E7080 (много мишеней, включая RET и VEGFR), герцептин (направлен на HER2/Erb2), PKI-166 (направлен на EGFR), канертиниб/CI-1033 (направлен на EGFR), сунитиниб/SU-11464/сутент (направлен на EGFR и FLT3), матузумаб/Emd7200 (направлен на EGFR), ЕКВ-569 (направлен на EGFR), Zd6474 (направлен на EGFR и VEGFR), PKC-412 (направлен на VEGFR и FLT3), Vatalanib/Ptk787/ZK222584 (направлен на VEGFR), CEP-701 (направлен на FLT3), SU5614 (направлен на FLT3), MLN518 (направлен на FLT3), XL999 (направлен на FLT3), VX-322 (направлен на FLT3), Azd0530 (направлен на SRC), BMS-354825 (направлен на SRC), SKI-606 (направлен на SRC), CP-690 (направлен на JAK), AG-490 (направлен на JAK), WHI-P154 (направлен на JAK), WHI-P131 (направлен на

промежуток времени, составляющий дни, недели или годы, для достижения желаемого эффекта, как дополнительно предложено в настоящем изобретении (например, для предотвращения или лечения сердечно-сосудистого заболевания или состояния или связанного с ЦНС заболевания или состояния).

Согласно одному варианту реализации изобретения, фармацевтические композиции вводят путем внутривенной, интраартериальной, подкожной или внутримышечной инъекции жидкого препарата. Согласно другому варианту реализации изобретения, жидкие лекарственные формы включают растворы, суспензии, дисперсии, эмульсии, масла и т.п. Согласно одному варианту реализации изобретения, фармацевтические композиции вводятся внутривенно и, таким образом, представлены в форме, подходящей для внутривенного введения. Согласно другому варианту реализации изобретения, фармацевтические композиции вводятся интраартериально и, таким образом, представлены в форме, подходящей для интраартериального введения.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, композиции для применения в способах, описанных в настоящем изобретении, содержат растворы или эмульсии, которые согласно некоторым вариантам реализации изобретения представляют собой водные растворы или эмульсии, содержащие безопасное и эффективное количество соединений, описанных в настоящем изобретении, и необязательно другие соединения, предназначенные для внутривенного или подкожного введения.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, различные составляющие композиции поставляются в предварительно измеренном и/или предварительно упакованном и/или готовом к применению виде без необходимости дополнительного измерения и т.д. Настоящее изобретение также необязательно включает наборы для проведения/применения способов и/или композиций согласно изобретению. В частности, указанные наборы необязательно включают, например, подходящий рекомбинантный слитый белок (и необязательно смеси ряда таких белков для осуществления синергических способов лечения, см. выше) и необязательно также подходящий связанный с заболеванием агент (агенты)). Дополнительно такие наборы также могут содержать подходящие вспомогательные вещества (например, фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества) для осуществления терапевтического и/или профилактического лечения согласно изобретению. Такие наборы необязательно содержат дополнительные компоненты для составления и/или применения композиции согласно изобретению, включая, но не ограничиваясь указанными, например, разбавители и т.д.

Композиции, описанные в настоящем изобретении, необязательно упакованы таким образом, что содержат все (или почти все) необходимые компоненты для осуществления способов согласно изобретению или для применения композиций согласно изобретению (необязательно включая, например, написанные инструкции по применению способов/композиций согласно изобретению). Например, наборы могут необязательно включать такие компоненты, как буферы, реагенты, сывороточные белки, антитела, субстраты и т.д. В случае предварительно упакованных реагентов наборы необязательно содержат предварительно измеренные или предварительно дозированные количества, готовые для использования в способах без дополнительного измерения, например, предварительно измеренные жидкие аликвоты или предварительно взвешенные или предварительно измеренные твердые реагенты, которые конечный пользователь набора может легко восстановить.

Такие наборы также, как правило, содержат подходящие инструкции для осуществления способов согласно изобретению и/или применения композиций согласно изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, компоненты наборов/упаковок предложены в стабилизированной форме таким образом, чтобы предотвратить разрушение или другие потери во время длительного хранения, например, в результате утечки. Ряд стабилизирующих процессов/агентов широко используется для реагентов и т.д., которые подлежат хранению, например, включение химических стабилизаторов (т.е. ингибиторов ферментов, бактерицидов/бактериостатиков, антикоагулянтов) и т.д. Реальный уровень дозы активных ингредиентов в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению можно изменять таким образом, чтобы получить количество активного ингредиента, которое является эффективным для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного субъекта, композиции и способа введения и не проявляет токсичности по отношению к указанному субъекту. Выбранный уровень дозы будет зависеть от различных фармакокинетических факторов, включая активность конкретной используемой композиции согласно настоящему изобретению, способ введения, время введения, скорость выведения конкретного используемого соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с конкретной используемой композицией, возраст, пол, массу тела, условия, общее состояние здоровья и предшествующую историю болезни субъекта, подлежащего лечению, и подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

Композиция должна быть стерильной и жидкой в той степени, в которой указанная композиция может быть доставлена с помощью шприца. Помимо воды носитель предпочтительно представляет собой изотонический буферный солевой раствор. Подходящую текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительным является включать в композиции изотонические агенты, например, сахара, полиспирты, такие как маннит или сорбитол и хлорид натрия.

Реальные уровни дозы активных ингредиентов в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению можно изменять таким образом, чтобы получить количество активного ингредиента, которое является эффективным для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного субъекта, композиции и способа введения и не проявляет токсичности по отношению к указанному субъекту. Выбранный уровень дозы будет зависеть от различных фармакокинетических факторов, включая активность конкретной используемой композиции согласно настоящему изобретению, способа введения, времени введения, скорости выведения конкретного используемого соединения, продолжительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, используемых в комбинации с конкретной используемой композицией, возраста, пола, массы тела, состояния, общего состояния здоровья и предшествующей истории болезни субъекта, подлежащего лечению, и подобных факторов, хорошо известных в области медицины.

Несмотря на то, что некоторые варианты реализации изобретения были описаны и проиллюстрированы в настоящем изобретении, специалисты в данной области техники легко смогут представить различные другие способы и/или структуры для осуществления функций и/или получения результатов и/или одного или более преимуществ, описанных в настоящем изобретении. Предполагается, что каждый из таких вариантов и/или модификаций находится в пределах объема вариантов реализации изобретения, описанных в настоящем изобретении. В более общем смысле, специалист в данной области техники легко оценит, что все параметры, размеры, материалы и конфигурации, описанные в настоящем изобретении, следует рассматривать как примеры, и что реальные параметры, расстояния, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного способа или способов применения, для которых применяется/применяются идея/идеи согласно изобретению. Специалисту в данной области техники будет очевидно или будет легко убедиться с использованием не более чем рутинных экспериментов, что существует множество эквивалентов конкретным вариантам реализации изобретения, описанным в настоящем изобретении. Следовательно, необходимо понимать, что предшествующие варианты реализации изобретения представлены исключительно в качестве примера и что в пределах объема прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов возможны способы практического осуществления вариантов реализации настоящего изобретения, отличные от конкретно описанных и заявленных в настоящем изобретении. Варианты реализации настоящего изобретения направлены на каждый отдельный признак, систему, изделие, материал, набор и/или способ, описанный в настоящем изобретении. Кроме того, любая комбинация из двух или более таких признаков, систем, изделий, материалов, наборов и/или способов, если такие признаки, системы, изделия, материалы, наборы и/или способы не являются взаимонесовместимыми, включены в объем настоящего изобретения.

Следует понимать, что все определения, приведенные и используемые в настоящем изобретении, имеют преимущественную силу по сравнению со словарными определениями, определениями в документах, включенных посредством ссылки, и/или обычными значениями определенных терминов.

Все ссылки, патенты и патентные заявки, описанные в настоящем изобретении, включены посредством ссылки и используются в отношении предмета, в связи с которым каждая из указанных ссылок цитируется, в некоторых случаях указанные ссылки могут включать цитируемый документ полностью.

Следует понимать, что употребление в настоящем изобретении и формуле изобретения предметов в единственном числе, если иное явно не следует из контекста, означает "по меньшей мере один".

Следует понимать, что фраза "и/или" при использовании в настоящем изобретении и формуле изобретения означает "любой или оба" из элементов, объединенных с помощью указанной фразы, т.е. элементы, которые присутствуют вместе в некоторых случаях и раздельно в других случаях. Множество элементов, перечисленных вместе с фразой "и/или" следует рассматривать так же, т.е. как "один или более" элементов, объединенных таким образом. Необязательно могут присутствовать другие элементы, отличные от элементов, конкретно обозначенных с помощью условия "и/или", связанные или не связанные с указанными конкретно обозначенными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера, ссылка на "А и/или В", при использовании вместе с неограничивающими фразами, такими как "содержащий", может относиться, согласно одному варианту реализации изобретения, только к А (необязательно включая элементы 5, отличные от В); согласно другому варианту реализации изобретения, только к В (необязательно включая элементы, отличные от А); согласно другому варианту реализации изобретения, к А и В (необязательно включая другие элементы) и т.д.

Следует понимать, что при использовании в настоящем изобретении и в формуле изобретения фраза "по меньшей мере один" со ссылкой на перечень одного или более элементов означает по меньшей мере один элемент, выбранный из любого одного или более элементов в указанном перечне элементов, но не обязательно включает по меньшей мере один из каждого и всех элементов, конкретно перечисленных в указанном перечне элементов, и не исключает любые комбинации элементов в указанном перечне элементов. Это определение также предполагает, что необязательно могут присутствовать элементы, отличные от элементов, конкретно обозначенных в перечне элементов, к которому относится указанная фраза "по меньшей мере один", связанные или несвязанные с указанными конкретно обозначенными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера, термин "по меньшей мере один из А и В" (или, эквивалентно, "по меньшей мере один из А или В" или, эквивалентно, "по меньшей мере

один из А и/или В") может относиться, согласно одному варианту реализации изобретения, по меньшей мере к одному (необязательно включая более чем один) А при отсуде В (и необязательно включая элементы, отличные от В); согласно другому варианту реализации изобретения, по меньшей мере к одному (необязательно включая более чем один) В при отсутствии А (и необязательно включая элементы, отличные от А); согласно другому варианту реализации изобретения, по меньшей мере к одному (необязательно включая более чем один) А и по меньшей мере к одному (необязательно включая более чем один) В (и необязательно включая другие элементы) и т.д.

Настоящее изобретение также обеспечивает набор для предотвращения, лечения или задержки сердечно-сосудистого заболевания или состояния у человека, где указанный набор содержит одну или более доз фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантный слитый белок, описанный в настоящем изобретении, используемый для предотвращения, лечения или задержки сердечно-сосудистого заболевания или состояния, и инструкции по применению фармацевтического препарата или композиции.

Настоящее изобретение также обеспечивает набор для предотвращения, лечения или задержки связанного с ЦНС заболевания или состояния у человека, где указанный набор содержит одну или более доз фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантный слитый белок, описанный в настоящем изобретении, используемый для предотвращения, лечения или задержки сердечно-сосудистого заболевания или состояния, и инструкции по применению фармацевтического препарата или композиции.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает набор для предотвращения, лечения или задержки сердечной недостаточности с сохранением фракции выброса у человека, где указанный набор содержит одну или более доз фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантный слитый белок, описанный в настоящем изобретении, используемый для предотвращения, лечения или задержки сердечной недостаточности с сохранением фракции выброса, и инструкции по применению фармацевтического препарата или композиции.

Следующие далее примеры представлены для более полной иллюстрации предпочтительных вариантов реализации изобретения. Однако следует понимать, что они никоим образом не ограничивают широкий объем настоящего изобретения.

Примеры

Пример 1. Клонирование и конструирование экспрессионных плазмид.

Последовательности ДНК, кодирующие тяжелые цепи рекомбинантных слитых белков (названные NPCFA и NPCF для последовательностей, содержащих и не содержащих мутации Fc соответственно) и легкую цепь рекомбинантных слитых белков (названную PAL) синтезировали в компании GENEWIZ (Сучжоу, Китай). Вектор экспрессии рСНОGUN получали из компании Horizon Discovery (Кембридж, Великобритания) по лицензионному договору. Конструирование экспрессионных плазмид осуществляли, как представлено на фиг. 1. Вкратце, вектор рСНОGUN линейаризовывали с помощью рестриционного фермента BfuAI и встраиваемые генные фрагменты, такие как NPCF, NPCFA и PAL, очищали после двойного переваривания рестриционными ферментами NcoI и AscI. Линейаризованный рСНОGUN/BfuAI и очищенный врываемый генный фрагмент лигировали в соответствии со стандартным протоколом и затем трансформировали в компетентные клетки E.coli DH5ийй. Клетки DH5ийй помещали в инкубатор и инкубировали в течение ночи при 37°C. Плазмиды рСНОGUN-NPCF, рСНОGUN-NPCFA и рСНОGUN-PAL выделяли и подтверждали с помощью переваривания рестриционным ферментом или ПНР. Плазмиду, содержащую вставку тяжелой цепи (рСНОGUN-NPCF или рСНОGUN-NPCFA), переваривали с помощью рестриционных ферментов BspEI и PciI, тогда как плазмиду, содержащую вставку легкой цепи (рСНОGUN-PAL), переваривали рестриционными ферментами NgoMIV и PciI. После переваривания с помощью рестриционных ферментов фрагменты, содержащие вставки тяжелой или легкой цепи, очищали, лигировали и затем трансформировали в клетки DH5ийй. Плазмидные конструкторы, содержащие вставки как тяжелой, так и легкой цепи (рСНОGUN-NPCF+PAL или рСНОGUN-NPCFA+PAL), идентифицировали и подтверждали путем переваривания с помощью рестриционных ферментов и секвенирования ДНК.

Пример 2. Продукция, очистка и характеристика антител.

HD-BIOP3, клеточную линию с отсутствием экспрессии глутаминсинтетазы ($GS^{-/-}$), полученную из клеток CHO K1, получали из компании Horizon Discovery (Кембридж, Великобритания) по лицензионному договору. Плазмидную ДНК выделяли с использованием коммерчески доступных наборов Qiagen Plasmid. Трансфекцию плазмидной ДНК в клетки HD-BIOP3 осуществляли с использованием коммерчески доступной системы электропорации от фирмы Lonza. Трансфицированные клетки помещали на 96-лучночные планшеты и проводили селекцию пулов с использованием стандартных процедур. Клетки из выбранных пулов культивировали во встряхиваемых колбах на 125 мл в течение 10-14 дней и среду собирали для очистки антител. Белки антител очищали с помощью аффинной хроматографии на основе белка А с последующей эксклюзионной хроматографией по размеру и анализировали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза и анализа с помощью Вестерн-блоттинга в соответствии со стандартными протоколами.

Фиг. 2А иллюстрирует схематическую структуру рекомбинантного слитого белка, описанного в настоящем изобретении. На фиг. 2В показаны репрезентативные данные, полученные в результате анализа

с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза. Результаты анализа с помощью Вестерн-блоттинга с выявлением с помощью первичных антител, специфичных в отношении активного фрагмента NRG-1, состоящего из 61 аминокислоты и содержащего связывающий HER3/4 домен ("NRG-1", R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота), или IgG, показаны на фиг. 2С и 2D соответственно.

Пример 3. Молекулярная целостность по результатам анализа связывания на основе ППР.

Целостность молекулярной структуры рекомбинантного слитого белка, описанного в настоящем изобретении, анализировали путем оценки его способности одновременно связываться с белком HER3 и антителом против NRG-1. His-меченный рекомбинантный белок HER3 (Sino Biological, Пекин, Китай) захватывали на сенсорный чип с иммобилизованными антителами против His (Thermo Fisher, Уолтем, Массачусетс) (этап 1), с последующим вводом образцов (включая рекомбинантный слитый белок, описанный в настоящем изобретении, рекомбинантный слитый белок, описанный в настоящем изобретении, без мутаций Fc, mAb против Her3 (Step 2) и антитело против NRG-1 (R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота) (этап 3). Присоединение His-HER3 к сенсорному чипу можно визуализировать по повышению сигнала по всем 6 каналам на этапе 1. Как рекомбинантный слитый белок, описанный в настоящем изобретении, так и рекомбинантный слитый белок, описанный в настоящем изобретении, без мутаций Fc, вызывали значительный ответ на этапе 2 в результате связывания с HER3 и на этапе 3 в результате связывания с вводимым антителом против NRG-1 (Ch1, 3), указывая на присутствие HER3-связывающего эпитопа и NRG-1 на рекомбинантном белке слияния, описанном в настоящем изобретении. Напротив, mAb против Her3 связывалось только с His-HER3 на этапе 2, но не связывалось с антителом против NRG-1 и буфером (этап 3) (Ch 4, 5), подтверждая отсутствие NRG-1-связывающей активности у молекулы mAb против Her3. Буфер вводили на этапах 2 и 3 в качестве холостого контроля. Следовательно, как HER3-связывающий эпитоп, так и NRG-1, присутствуют в рекомбинантном белке слияния согласно изобретению.

Сенсограмма связывания и образцы инъецируемых последовательностей показаны на фиг. 3.

Пример 4. Эффект на пролиферацию опухолевой клеточной линии *in vitro*.

Опухолевые клетки высевали на 96-луночные планшеты в концентрации 2,500-20,000 клеток на лунку в зависимости от кинетики роста каждой клеточной линии. Затем клетки обрабатывали рекомбинантным белком слияния, описанным в настоящем изобретении, антителом или контрольным белком в последовательном серийном разведении 1:4 в течение 5 дней. Выживаемость клеток оценивали с использованием счетчика клеток Kit-8 от компании Dojindo Molecular Technologies (Кумамото, Япония) в соответствии с инструкциями производителя. Данные анализировали с помощью программы GraphPad Prism и представляли как скорость роста по отношению к контрольным клеткам, не получавшим обработки.

Фиг. 4 включает репрезентативные графики, показывающие среднюю относительную скорость роста \pm SEM (n=3) для различных раковых клеточных линий: (A) NCI-N87, рак желудка; (B) MCF-7, рак молочной железы; (C) RT-112, рак мочевого пузыря; и (D) T47D, рак молочной железы. По сравнению с контрольными NRG-1 и белками слияния mAb GP120/NRG-1, рекомбинантный слитый белок, описанный в настоящем изобретении, демонстрирует значительно более низкую активность в стимулировании пролиферации раковых клеток.

Пример 5. Активация сигнального пути PI3K/АКТ в кардиомиоцитах человека.

Кардиомиоциты человека, полученные из компании Cellular Dynamics (Мэдисон, Висконсин) высевали на 96-луночные планшеты, покрытые 0,1%-ым желатином, и позволяли восстанавливаться в среде для посева (Cellular Dynamics) в течение 4 ч. Затем клетки культивировали в поддерживающей среде (Cellular Dynamics) в течение 96 ч до использования в эксперименте. Для оценки способности рекомбинантного слитого белка согласно изобретению активировать сигнальный путь HER2:HER4 в кардиомиоцитах, клетки сначала подвергали голоданию в бессывороточной среде в течение 4 и затем обрабатывали рекомбинантным белком слияния или контрольными агентами (NRG-1, mAb GP120/NRG-1, mAb против Her3 или mAb GP120) в последовательных серийных разведениях 1:4 в течение 15 мин. В конце лечения клетки лизировали и анализировали фосфорилирование АКТ с использованием набора для выявления фосфо-АКТ/общего АКТ с помощью твердофазного ИФА от компании Abcam (Кембридж, Массачусетс) в соответствии с инструкциями производителя. Данные анализировали с помощью программы GraphPad Prism и представляли как отношение фосфо-АКТ к общему АКТ по сравнению с контрольными клетками, не получавшими обработки.

Для анализа с помощью Вестерн-блоттинга клетки высевали в 6-луночные планшеты и обрабатывали рекомбинантным белком слияния согласно изобретению или контрольными агентами в одной концентрации, составляющей 16 нМ. В конце обработки клетки лизировали в лизирующем буфере RIPA, содержащем ингибиторы протеаз и фосфатаз. ДСН-ПААГ-электрофорез и анализ с помощью Вестерн-блоттинга проводили в соответствии со стандартными протоколами. Общий АКТ и фосфо-АКТ окрашивали с помощью кроличьих антител против АКТ и кроличьих антител против p-АКТ(S473) (Cell Signaling; Данверс, Массачусетс) соответственно.

На фиг. 5 показано фосфорилирование АКТ в ответ на стимул в кардиомиоцитах человека. Результаты предполагают, что рекомбинантный слитый белок, описанный в настоящем изобретении, может активировать сигнальный путь HER2:HER4 в кардиомиоцитах с активностью, сравнимой с NRG-1.

Пример 6. Индукция димеризации HER2:HER3 и димеризации HER2:HER4.

Анализ димеризации PathHunter, разработанный компанией Eurofins DiscoverX (Фримонт, Калифорния), выявляет вызванную лигандом димеризацию двух субъединиц пары рецептор-димер. Принцип анализа проиллюстрирован на фиг. 6А. Фермент β -gal расщеплен на два фрагмента, ProLink (PK) и рецептор фермента (EA). Были сконструированы клетки для ко-экспрессии белка-мишени 1, слитого с донором фермента PK, и белка-мишени 2, слитого с акцептором фермента EA. Связывание лиганда с одним белком-мишенью вызывает его взаимодействие с другим белком-мишенью, приводя к комплементарному взаимодействию двух фрагментов фермента и ферментативной реакции с высвобождением хемиллюминесцентного сигнала, который выявляется как относительные единицы флуоресценции, или ОЕФ.

Клеточную линию U2OS для димеризации ErbB2/ErbB4 и ErbB2/ErbB3 PathHunter получали из компании Eurofins DiscoverX. Клетки высевали в концентрации 4,000 клеток/лунку в 384-луночные планшеты и инкубировали при 37°C/5% CO₂ в течение ночи. Исследуемые агенты готовили в последовательных серийных разведениях 1:4, начиная с 28,8 нМ, и затем добавляли к клеткам в 384-луночных планшетах. Через 4 часа инкубирования клетки анализировали на предмет димеризации рецептора в соответствии с инструкциями производителя. Данные анализировали с помощью программы GraphPad Prism и представляли как среднее ОЕФ \pm SEM (n=3).

Как показано на фиг. 6В и 6С, рекомбинантный слитый белок, описанный в настоящем изобретении может вызывать димеризацию HER2/HER4 с активностью, сравнимой с NRG-1, тогда как его способность вызывать димеризацию HER2/HER3 намного слабее. Ни антитело mAb GP120, используемое в качестве контроля изотипа, ни mAb против Her3, используемые в качестве отрицательных контролей для исследования, не вызывали димеризацию рецепторов.

Варианты реализации настоящего изобретения были описаны со ссылкой на сопутствующие графические материалы, однако, следует понимать, что изобретение не ограничивается конкретными вариантами реализации и что специалисты в данной области техники могут осуществлять их различные вариации и модификации в пределах сущности и объема изобретения, как определено в прилагаемой формуле изобретения.

Пример 7. In vivo эффективность рекомбинантного слитого белка на крысиной модели систолической сердечной недостаточности.

Для оценки способности рекомбинантного слитого белка восстанавливать функцию сердца на модели заболевания использовали модель инфаркта миокарда и систолической сердечной недостаточности на крысах Sprague Dawley. Для установления модели заболевания использовали шелковую хирургическую нить 6-0 для перевязки левой передней нисходящей коронарной артерии (LAD) на 3-4 мм ниже ушка левого предсердия в ходе хирургической процедуры. Через четыре недели после перевязки записывали фракцию выброса (EF) с помощью эхокардиографии в М-режиме (ЭхоКГ) с ультразвуковой доплерографией для измерения сердечной функции относительно исходной EF до хирургического вмешательства. Для включения в последующее исследование порог составлял снижение EF как минимум на 30%. Ложно-оперированные контрольные животные подвергались идентичной хирургической процедуре без перевязки LAD.

После установления модели заболевания животных делили на пять групп по одиннадцать крыс в каждой с дополнительными десятью ложно-оперированными крысами, включенными в шестую группу. Исследование планировали для каждой группы таким образом, чтобы обеспечить введение инъекций в хвостовую вену два раза в неделю в течение периода, составляющего четыре недели, или в общем восемь инъекций. Группе ложно-оперированных животных и группе отрицательного контроля, получающей носитель, вводили солевой раствор, три группы получали рекомбинантный слитый белок в концентрации 1,3, или 10 мг/кг, и последняя группа получала положительный контроль, представляющий собой слитый белок mAb GP120/NRG-1 (10 мг/кг).

Из-за потери массы тела, наблюдаемой во время исследования, лечение останавливали до завершения введения восьми последовательных инъекций в группах, получавших рекомбинантный слитый белок в концентрации 3 мг/кг и 10 мг/кг, при этом указанные группы получили только шесть и три инъекции соответственно. Все другие группы получали полный набор из восьми инъекций.

Через четыре недели после первого лечения снова измеряли EF с помощью ЭхоКГ в М-режиме. Как показано на фиг. 8, рекомбинантный слитый белок значительно повышал EF относительно исходного уровня во всех трех группах, получавших разные дозы. В частности, повышение на 14,7% (P<0,001), 26,9% (P<0,001) и 36,6% (P < 0,001) наблюдалось для групп, получавших дозу 1, 3, и 10 мг/кг соответственно. Положительный контроль, представляющий собой mAb GP120/NRG-1, повышал EF на 28,8% (P<0,001) в соответствующую точку времени. Солевой раствор не показал эффекта ни в ложно-оперированной контрольной группе, ни в контрольной группе, получавшей носитель.

После получения значений ЭхоКГ на 28 день после лечения мышей умерщвляли и ткани сердца, прилежащие к области хирургического вмешательства, собирали, фиксировали в 4% формальдегиде и погружали в парафин. Парафиновые срезы ткани сердца толщиной пять микрометров окрашивали с помощью красителей гематоксилина и эозина и наблюдали гистологические изменения с помощью свето-

вого микроскопа. Как показано на фиг. 9, в группе ложно-оперированных животных кардиомиоциты были организованы упорядоченно и цитоплазма и миокардиальные волокна равномерно окрашивались. Не наблюдалось инфильтрации воспалительных клеток в межклеточном пространстве и не было обнаружено некроза миокарда. Напротив, в контрольной группе, получавшей носитель, в краевой зоне инфаркта миокарда наблюдались увеличенные промежутки между клетками миокарда, ядра были конденсированы и разрушены и организация миокардиальных волокон утрачивала упорядоченную структуру, клетки были увеличены в размере и был обнаружен интерстициальный отек. Лечение рекомбинантным белком слияния частично ослабляло патологические изменения в зоне инфаркта миокарда, включая значительное снижение количества некротизированных клеток, сужение межклеточного пространства между клетками миокарда и восстановление организации миокардиальных волокон в направлении нормальной структуры.

Пример 8. Рекомбинантный слитый белок ослаблял опухолевый рост на модели подкожного ксенотрансплантата карциномы FaDu на мышах NOD/SCID.

Для оценки потенциального риска стимуляции опухолевого роста рекомбинантным белком слияния проводили *in vivo* исследование на модели ксенотрансплантата карциномы FaDu. Мышей NOD/SCID (Beijing AK Bio-Technology Co. Ltd.) содержали в SPF-помещении Центра CrownBio international R&D (Пекин, Китай) в соответствии с институциональными правилами. Все эксперименты проводили в соответствии с требованиями Международной ассоциации оценки и аккредитации лабораторных исследований на животных (AAALAC) и с разрешения Институционального комитета по содержанию и использованию животных (CrownBio IACUC).

Самкам мышей NOD/SCID возрастом 7-10 недель инокулировали подкожно в правый бок опухолевые клетки FaDu (3×10^6), суспендированные в 0,1 мл ФСБ. Когда опухоли достигали объема примерно 150 мм^3 , мышей рандомизировали и сортировали в 6 исследуемых групп по 8 животных на группу. Исследуемые образцы вводили внутривенно путем инъекции в хвостовую вену два раза в неделю в течение трех последовательных недель (в общем 6 обработок). За опухолевым ростом наблюдали путем измерений с помощью штангенциркуля. Исследование завершали на 21 день после лечения.

Результаты по опухолевому росту в ответ на различные лечения суммированы на фиг. 10. mAb против Her3 в концентрации 10 мг/кг показало значительную противоопухолевую активность с ингибированием опухолевого роста (TGI), составляющим 93,5% на конец исследования ($p < 0,001$ по сравнению с группой, получавшей носитель). Рекомбинантный слитый белок также продемонстрировал статистически значимое TGI на конец исследования: 19,2% при дозе 1 мг/кг ($p = 0,048$ по сравнению с группой, получавшей носитель) и 56,2% при дозе 10 мг/кг ($p < 0,001$ по сравнению с группой, получавшей носитель). Контрольная молекула, представляющая собой слитый белок mAb GP120/NRG-1, не показала противоопухолевой активности ни при высокой, ни при низкой дозе. Во время исследования ни одно животное не умерло. Все исследуемые агенты хорошо переносились мышами, имеющими опухоли. Не наблюдалось значительной потери массы тела в какой-либо экспериментальной группе (фиг. 11). Указанные данные показывают, что в условиях активного опухолевого роста *in vivo* рекомбинантный слитый белок проявляет дозозависимое подавление опухолевого роста и предполагают, что риск увеличения или ускорения опухолевого роста рекомбинантным белком слияния *in vivo* ниже по сравнению с соответствующим риском для нативного белка NRG-1.

Пример 9. Не наблюдалось значительной токсичности в отношении желудочно-кишечного тракта у макаков-крабоедов, которым вводили рекомбинантный слитый белок.

Ранее было описано, что в клиническом исследовании первой фазы (NCT01258387), в котором субъекты получали либо плацебо, либо однократное введение цитаглермина (полноразмерного рекомбинантного NRG-1 β), рвота и диарея были вторым и четвертым наиболее распространенным нежелательным явлением, возникшим в ходе лечения, которые наблюдались в 40% и 27% случаев соответственно для объединенных групп, получавших высокие дозы (Lenihan et al. *J Am Coll Cardiol Basic Trans Science*. 2016;1(7):576-86). Подобным образом, в исследовании второй фазы пептидного фрагмента рекомбинантного NRG-1 (нейкардина), рвота была наиболее распространенным нежелательным явлением, возникшим в ходе лечения, и наблюдалась у 20% субъектов, проходивших исследование (Jabbour et al. *European Journal of Cardiac Failure* (2011) 13: 83-92). Наконец, в другом исследовании второй фазы нейкардина (ChiCTR-TRC-00000414) опубликованные результаты показали, что 48,4% наблюдаемых нежелательных явлений были связаны с ЖКТ и представляли собой наиболее часто наблюдаемый тип нежелательных явлений в этом исследовании и коррелировали с уровнем дозы (Gao et al. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55:1907-14).

Два исследования проводили для оценки безопасности и переносимости рекомбинантного слитого белка на макаках-крабоедах (*Macaca fascicularis*): исследование однократной дозы не по стандарту GLP (Своду международных требований к лабораторным исследованиям) и исследование многократных доз по стандарту GLP. За токсичностью в отношении желудочно-кишечного тракта тщательно следили. В исследовании однократной дозы безопасность и переносимость рекомбинантного слитого белка оценивали при уровне дозы, составляющем 10, 30 и 60 мг/кг, по сравнению с контролем, представляющим со-

бой носитель, при этом в каждую группу был включен один самец и одна самка. В данном исследовании с введением однократной дозы не было обнаружено связанных с исследуемым агентом эффектов на массу тела или качественную оценку пищи на протяжении послелечебного периода оценки, составляющего две недели, и не наблюдалось рвоты или диареи. В GLP-исследовании с многократным введением доз безопасность и переносимость рекомбинантного слитого белка оценивали после четырех последовательных еженедельных введений при уровне дозы, составляющем 3, 10 и 30 мг/кг, по сравнению с контролем, представляющим собой носитель, при этом каждая группа включала трех самцов и трех самок, в течение периода основного исследования, составляющего 28 дней, а также дополнительно двух самцов и двух самок в группе, получавшей дозу 30 мг/кг, и контрольной группе, получавшей носитель, которым проводили оценку после последующего восстановительного периода в течение 28 дней. Не наблюдалось связанных с исследуемым агентом эффектов на потребление пищи в данном исследовании с многократным введением дозы. При том, что наблюдалась связанная с исследуемым агентом рвота в данном исследовании с многократным введением доз, клинические наблюдения рвоты были связаны исключительно с реакциями инфузии и наблюдались только у одного животного в группе, получавшей дозу 10 мг/кг (17%), и двух животных в группе, получавшей дозу 30 мг/кг (20%), и были проходящими. Диарея наблюдалась только в контрольной группе, получавшей носитель, и группе, получавшей рекомбинантный слитый белок в дозе 30 мг/кг, только у одного (10%) и трех (30%) животных соответственно, и считалась нормой для этого типа процедуры и не связанной с рекомбинантным белком слияния явлениям. Наконец, в данном исследовании с многократным введением доз средняя масса тела снижалась на >10% по сравнению с исходным уровнем только при уровне дозы 10 мг/кг и 30 мг/кг и только после введения четвертой дозы в группе, получавшей дозу 10 мг/кг, и третьей и четвертой дозы в группе, получавшей дозу 30 мг/кг. Вкратце, лечение рекомбинантным белком слияния не приводило к каким-либо клинически значимым наблюдениям, связанным с приемом пищи, рвотой или диареей, отличным от реакций, сопровождающих острые реакции инфузии, и наблюдения, связанные с желудочно-кишечным трактом не влияли на определение уровня без наблюдаемых нежелательных явлений в каком-либо исследовании. Данные результаты указывают, что конструкция рекомбинантного слитого белка ослабляет нежелательный эффект рекомбинантного белка NRG-1 на желудочно-кишечный тракт.

Образцы крови (~1 мл) собирали от макаков-крабоедов после введения однократной дозы, составляющей 60 мг/кг рекомбинантного слитого белка, в разные временные точки и сыворотку выделяли и хранили при -80°C до проведения исследования. Концентрации рекомбинантного слитого белка в образцах сыворотки анализировали путем ИФА-захвата в соответствии со стандартными процедурами. Вкратце, 96-луночные планшеты покрывали рекомбинантным человеческим белком HER3 (R&D System), блокировали с помощью БСА и инкубировали с исследуемыми образцами. После многократных промывок планшеты инкубировали с HRP-конъюгированным антителом против Fc IgG человека и затем выявляли с помощью ТМВ-субстрата. На фиг. 12 показано, что фармакокинетический профиль рекомбинантного слитого белка подобен антителу IgG.

Пример 10. Обобщенные результаты кинетических констант по связыванию Fc-рецептора.

Аффинность связывания между рекомбинантным слитым белком mAb против Her3/NRG-1 и Fc-рецепторами измеряли с использованием безмаркерного метода поверхностного плазмонного резонанса (НИР). В общем шесть Fc рецепторов (каждый из которых был слит с His-меткой), включая FcγRI (Abeam), FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa (158F), FcγRIIIa (158V) и C1q (Sino Biological), анализировали на связывание с рекомбинантным слитым белком, рекомбинантным слитым белком без мутаций Fc и антител против HER3 соответственно. Все Fc-рецепторы и исследуемые образцы были очищены с помощью аффинной хроматографии. Все эксперименты осуществляли на системах Biacore 8K (GE Healthcare) с использованием HBS-EP+ (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,05% (по объему) ПАВ P20) в качестве подвижного буфера. В частности, антитело против His было присоединено как к активной, так и референсной проточной кювете сенсорного чипа CM5 с помощью метода иммобилизации по аминокислотной группе. Очищенные His-меченные Fc-рецепторы захватывались на активную проточную кювету каждого отдельного канала путем связывания с иммобилизованным антителом против His. Уровень захвата для каждого рецептора Fc поддерживался между 80 и 120RU. Для кинетического анализа рекомбинантный слитый белок и все другие образцы серийно разводили в общем до 6 концентраций, варьирующих от 0,3 до 30 нМ и указанные серийные разведения вносили последовательно в обе проточные кюветы по каждому каналу. Несколько анализов осуществляли в одном цикле путем одновременного введения образцов через множество каналов.

Полученные в результате сенсограммы приводили к модели связывания с двумя состояниями для выведения кинетических констант с использованием программы Biacore 8K Evaluation. Равновесные константы диссоциации (KD) для всех анализов суммированы в таблице, ниже. Выведенные их кинетических параметров значения KD связывания рекомбинантного слитого белка с FcγRI, FcγRIIa и FcγRIIb более чем в 10 раз превышали значения для рекомбинантного слитого белка без мутаций Fc и антитела против HER3, указывая на то, что специфичная мутация в Fc-участке рекомбинантного слитого белка приводит к значительному снижению аффинности. При FcγRIIIa (158F) и FcγRIIIa (158V) соответственно

мутации Fc привели к 2-3-кратному снижению аффинности связывания для рекомбинантного слитого белка. Связывание с C1q во всех образцах было слишком слабым для возможности выявления.

Для подтверждения того, что рекомбинантный слитый белок имеет ограниченные Fc-эффекторные функции, проверяли антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) с использованием репортерного биоанализа АЗКЦ от компании Promega (Мэдисон, Висконсин). В анализе использовали сконструированную клеточную линию Jurkat в качестве эффекторных клеток, которые стабильно экспрессировали рецептор FcγRIIIa (V158) и элемент отклика NFAT, который запускает экспрессию люциферазы светлячка. Ритуксимаб, используемый в качестве положительного контроля для анализа, показал сильную АЗКЦ активность в отношении CD20-положительных клеток Raji; тогда как рекомбинантный слитый белок не имел выявляемой АЗКЦ в отношении HER3-положительных клеток-мишеней (MCF7 или BT474) (данные не представлены).

Сводная таблица кинетических констант по связыванию Fc-рецепторов

Fc-рецепторы	KD (M)		
	MAb против Her3/NRG-1	MAb против Her3/NRG-1 (без мутаций Fc)	
		MAb против Her3	
FcγRI	1,03E-08	2,81E-09	4,56E-09
FcγRIIIa	1,35E-06	3,95E-07	1,50E-07
FcγRIIb	1,52E-06	1,03E-07	1,04E-08
FcγRIIIa (158F)	1,18E-07	6,37E-08	1,66E-07
FcγRIIIa (158V)	9,10E-08	3,41E-08	3,80E-08
C1q	< LOD*	< LOD*	< LOD*

* < LOD - ниже порога чувствительности (limit of detection, LOD) из-за слабого связывания.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный слитый белок, содержащий активный фрагмент кардиопротективного белка нейрегулина-1 (NRG-1), слитый с моноклональным антителом (mAb), которое является моноспецифичным в отношении ErbB3 (HER3), где фрагмент NRG-1 связывается и индуцирует сигналинг через ErbB4 (HER4).

2. Рекомбинантный слитый белок по п.1, отличающийся тем, что активный фрагмент NRG-1 содержит активный домен NRG-1.

3. Рекомбинантный слитый белок по п.1 или 2, отличающийся тем, что фрагмент NRG-1 содержит связывающий домен ERBB3/4.

4. Рекомбинантный слитый белок по п.1, отличающийся тем, что mAb ингибирует сигналинг NRG-1 через ErbB3 (HER3).

5. Рекомбинантный слитый белок по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что указанный фрагмент NRG-1 содержит изоформу NRG-1β2a.

6. Рекомбинантный слитый белок по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что фрагмент NRG-1 слит через его N-концевую аминокислоту с C-концом тяжелой цепи антитела с помощью линкера.

7. Рекомбинантный слитый белок по п.6, отличающийся тем, что указанный линкер содержит по меньшей мере одну копию линкера Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, представленного в последовательности SEQ ID NO: 5.

8. Рекомбинантный слитый белок по п.6, отличающийся тем, что C-конец тяжелой цепи антитела содержит Fc-домен антитела.

9. Рекомбинантный слитый белок по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что моноклональное антитело гликозилировано.

10. Рекомбинантный слитый белок по п.9, отличающийся тем, что гликозилирование представляет собой N-гликозилирование или O-гликозилирование.

11. Рекомбинантный слитый белок по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что фрагмент NRG-1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

12. Рекомбинантный слитый белок по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что mAb содержит тяжелую цепь, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2.

13. Рекомбинантный слитый белок по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что mAb содержит легкую цепь, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:3.

14. Рекомбинантный слитый белок по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что зрелое mAb содержит мутацию по типу замены по меньшей мере в одной из аминокислот 234, 239 и 434 последова-

тельности SEQ ID NO: 2.

15. Рекомбинантный слитый белок по п.14, отличающийся тем, что по меньшей мере одна мутация по типу замены включает мутацию L234F, мутацию S239A, мутацию N434A или их комбинацию.

16. Рекомбинантный слитый белок по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный слитый белок содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 14.

17. Рекомбинантный слитый белок по любому из пп.1-16, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный слитый белок снижает пролиферацию опухолевых или раковых клеток по сравнению с рекомбинантным NRG-1.

18. Рекомбинантный слитый белок по любому из пп.1-17, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный слитый белок стимулирует пролиферацию, дифференцировку и выживаемость кардиомиоцитов.

19. Рекомбинантный слитый белок по любому из пп.1-18, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный слитый белок стимулирует пролиферацию, дифференцировку и выживаемость клеток сердечной ткани.

20. Рекомбинантный слитый белок по любому из пп.1-19, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный слитый белок обладает сниженной способностью вызывать антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ).

21. Рекомбинантный слитый белок по любому из пп.1-21, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный слитый белок стимулирует сигналинг HER2/4 в отличие от сигналинга HER2/3 по сравнению с индукционным потенциалом рекомбинантного NRG-1.

22. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая рекомбинантный слитый белок по любому из пп.1-21.

23. Рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты по п.22, где рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой рекомбинантный вектор.

24. Рекомбинантная клетка, содержащая рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты по п.23.

25. Фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный слитый белок по любому из пп.1-21.

26. Способ лечения сердечно-сосудистого заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного слитого белка по любому из пп.1-21 или фармацевтической композиции по п.25.

27. Способ по п.26, отличающийся тем, что лечение приводит к ослаблению признака или симптома сердечно-сосудистого заболевания или состояния у субъекта.

28. Способ предотвращения, ингибирования, подавления или задержки начала развития сердечно-сосудистого заболевания или состояния у субъекта, включающий введение эффективного количества рекомбинантного слитого белка по любому из пп.1-21 или фармацевтической композиции по п.25.

29. Способ по любому из пп.26-28, отличающийся тем, что сердечно-сосудистое заболевание или состояние представляет собой хроническую сердечную недостаточность/застойную сердечную недостаточность (ЗСН), острую сердечную недостаточность/инфаркт миокарда (ИМ), систолическую дисфункцию левого желудочка, реперфузионное повреждение, связанное с ИМ, вызванную химиотерапией кардиотоксичность (у взрослого или ребенка), вызванную радиацией кардиотоксичность, дополнительное лечение к хирургическому вмешательству при врожденном заболевании сердца у детей.

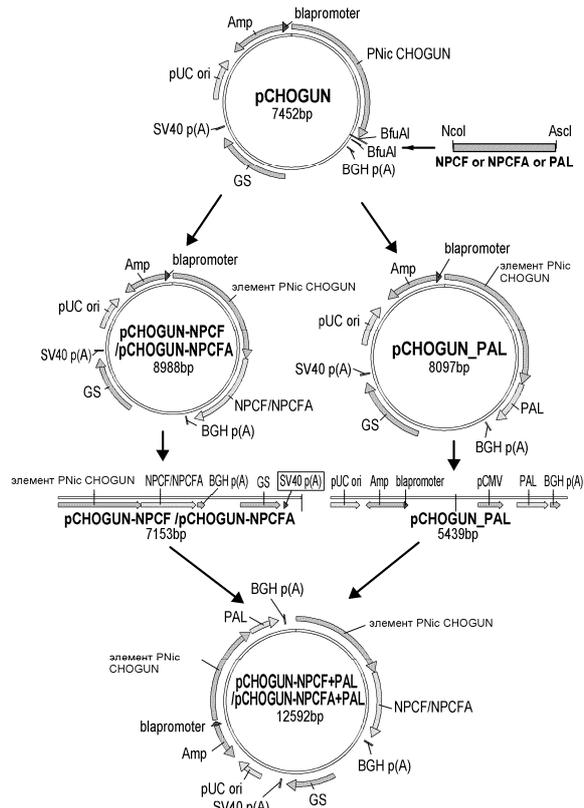
30. Способ по п.29, отличающийся тем, что вызванная химиотерапией кардиотоксичность является результатом получения субъектом антрациклинов, алкилирующих агентов, антимиотубулиновых агентов и антиметаболитных агентов, используемых в качестве химиотерапии.

31. Способ по любому из пп.26-28, отличающийся тем, что сердечно-сосудистое состояние представляет собой кардиотоксичность в результате получения субъектом противораковой терапии.

32. Способ по п.31, отличающийся тем, что противораковая терапия представляет собой направленную против HER-2 терапию.

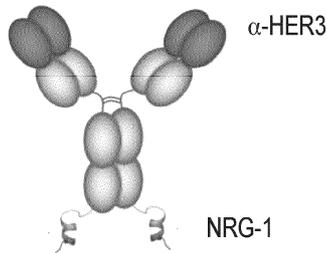
33. Способ по п.32, отличающийся тем, что направленная против HER-2 терапия включает применение трастузумаба, адо-трастузумаба эмтанзина, лапатиниба, нератиниба и пертузумаба, любого агента против HER2, любого агента против HER2 или их комбинации.

34. Набор для лечения, предотвращения, ингибирования, подавления или задержки начала развития сердечно-сосудистого заболевания или состояния, содержащий эффективное количество рекомбинантного белка по любому из пп.1-21 или фармацевтической композиции по п.25.



Фиг. 1

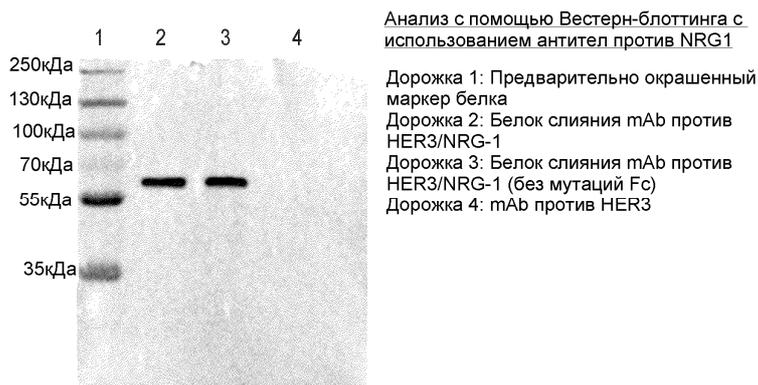
Схематичная молекулярная структура белка слияния mAb против HER3/NRG-1



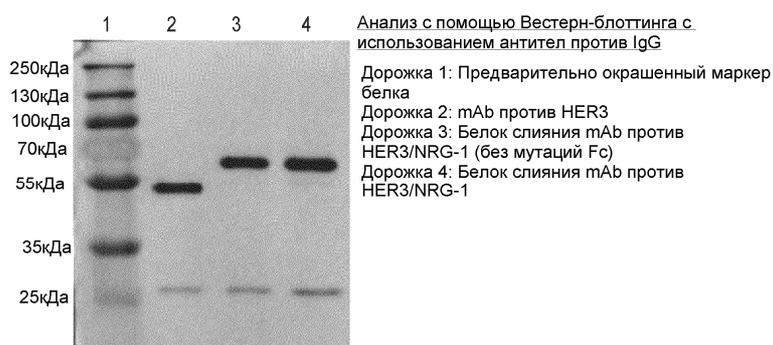
Фиг. 2А



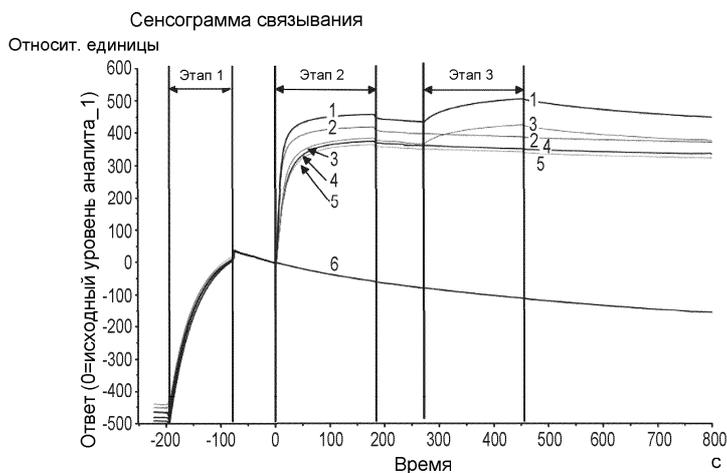
Фиг. 2В



Фиг. 2С



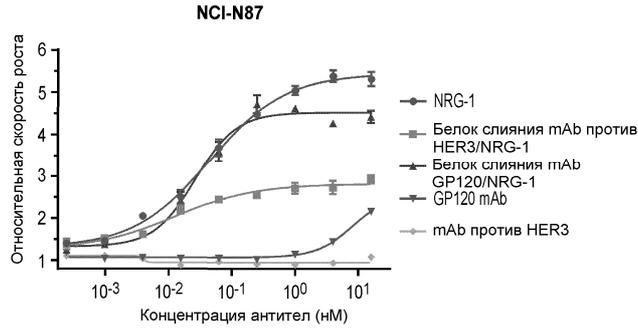
Фиг. 2D



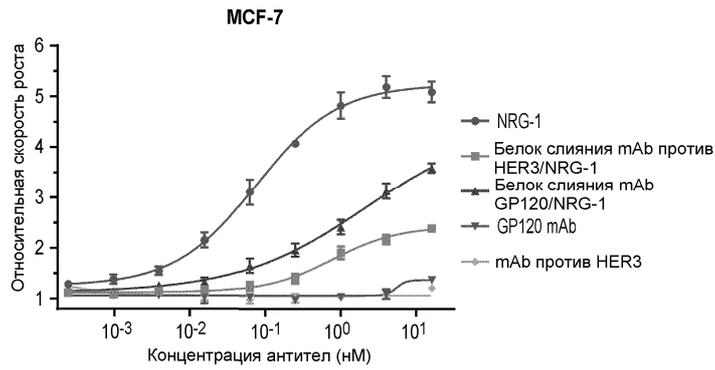
Описание образца

Кри- вая	Образец		
	Этап 1	Этап 2	Этап 3
1	HER3	Белок слияния mAb против HER3/NRG-1	mAb против NRG1
2	HER3	Белок слияния mAb против HER3/NRG-1	Буфер
3	HER3	Белок слияния mAb против HER3/NRG-1 (без мутац. Fc)	mAb против NRG1
4	HER3	mAb против HER3	mAb против NRG1
5	HER3	mAb против HER3	Буфер
6	HER3	Буфер	Буфер

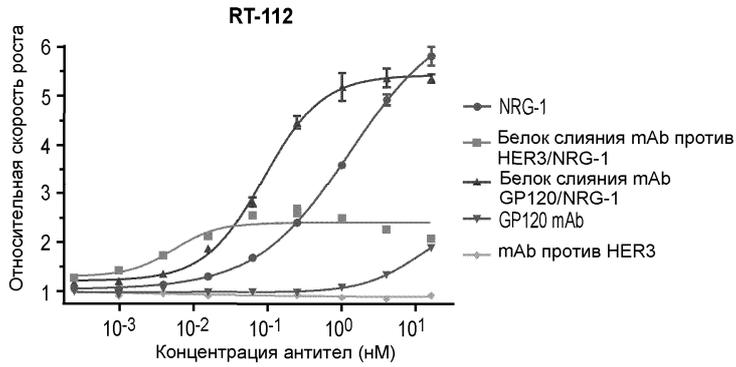
Фиг. 3



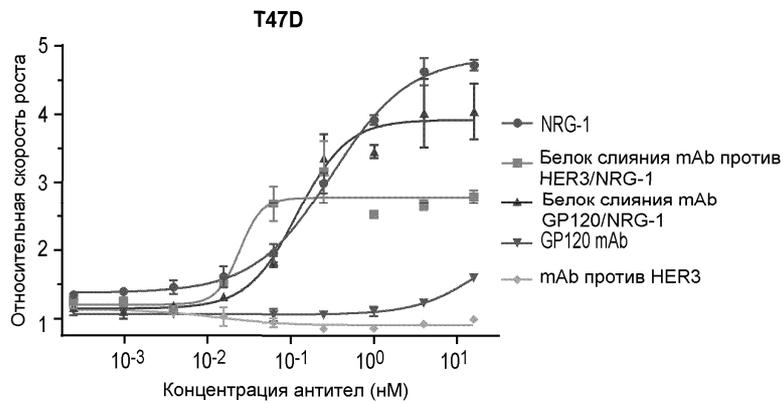
Фиг. 4А



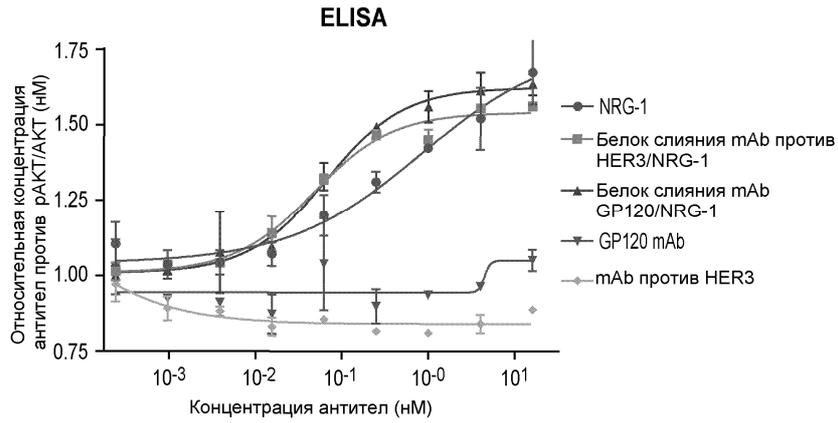
Фиг. 4В



Фиг. 4С

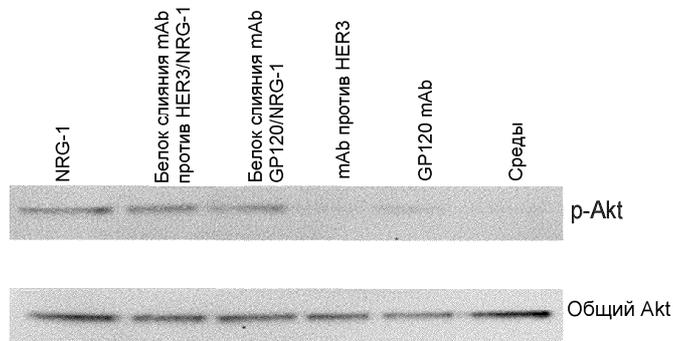


Фиг. 4D

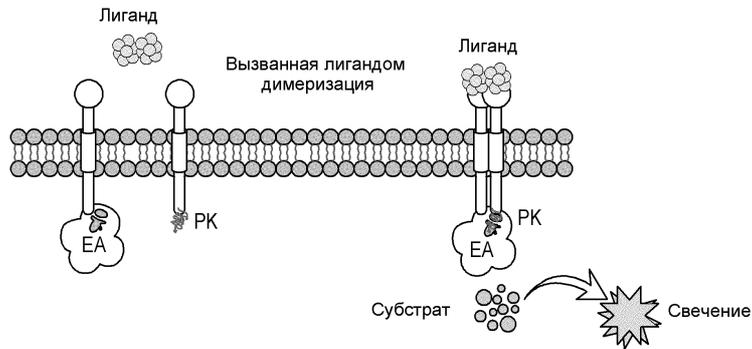


Фиг. 5А

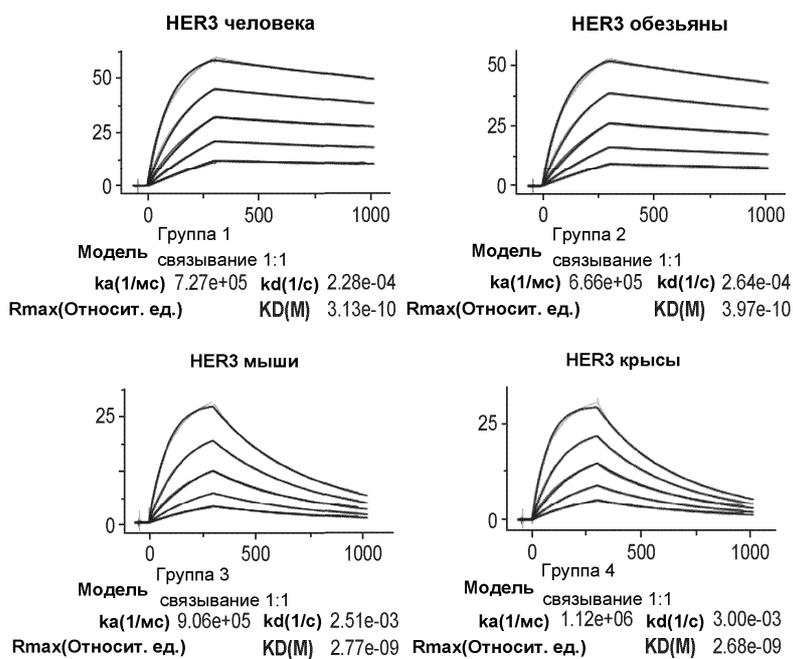
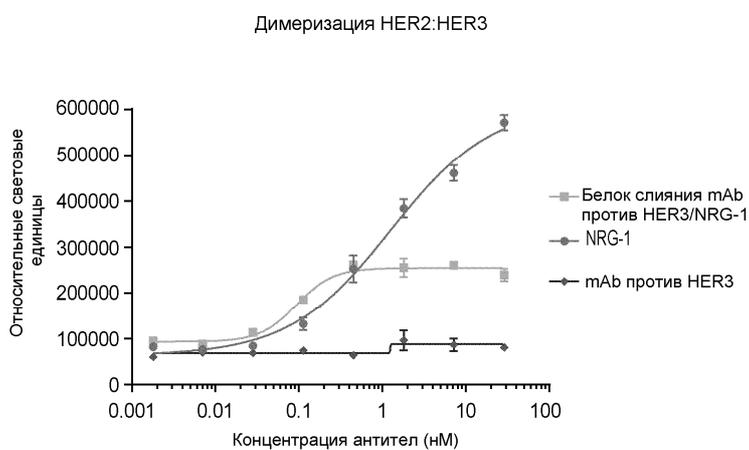
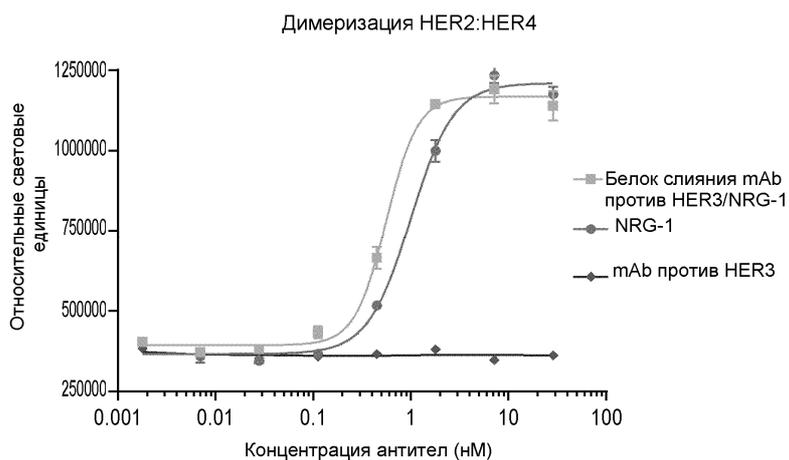
Анализ фосфорилирования АКТ с помощью Вестерн-блоттинга

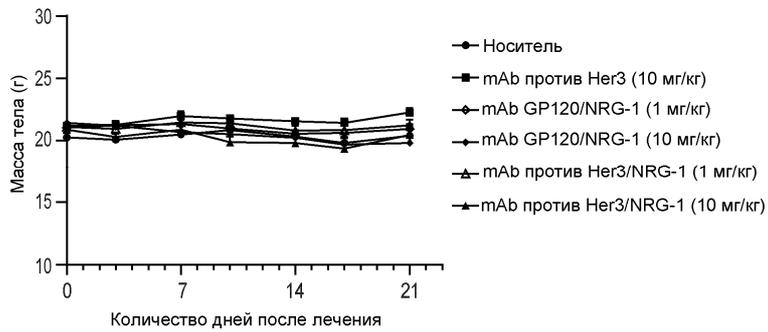
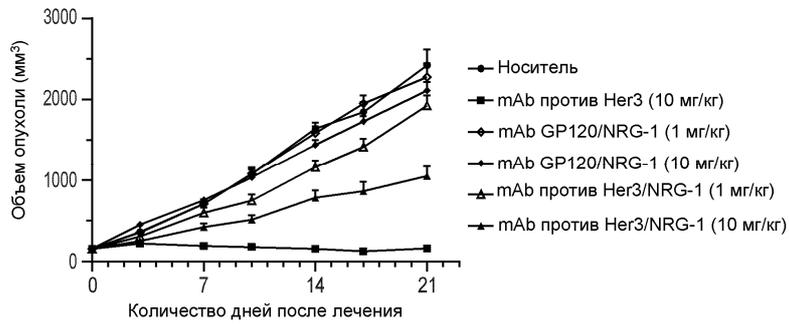
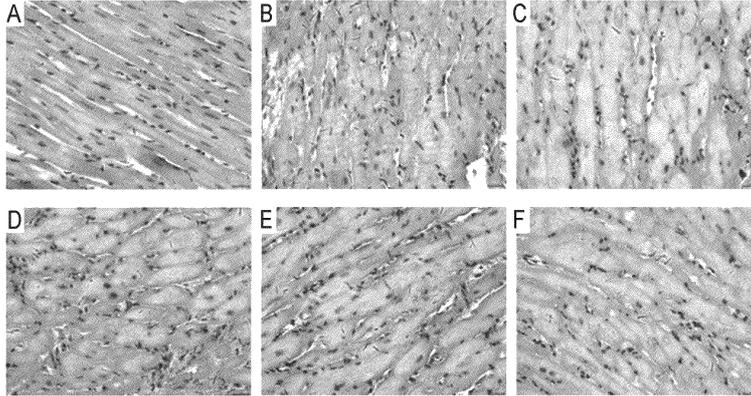
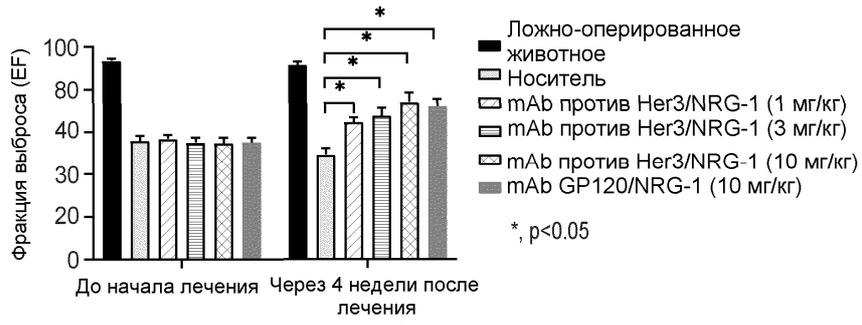


Фиг. 5В

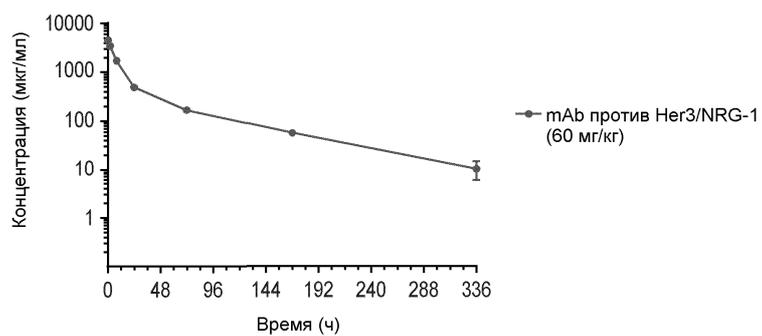


Фиг. 6А





046026



Фиг. 12



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2
