

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 046847

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.04.26

(21) Номер заявки
202192288

(22) Дата подачи заявки
2020.03.31

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

(54) СОЕДИНЕНИЯ НА ОСНОВЕ НЕЙРЕГУЛИНА-4 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/827,386

(32) 2019.04.01

(33) US

(43) 2022.01.21

(86) PCT/US2020/025921

(87) WO 2020/205840 2020.10.08

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
Дей Джонатан Уэсли, Хойер Йосеф
Джордж, Муппиди Авинаш, Ни Уэй,
Панкук Джеймс Дэвид (US)

(74) Представитель:
Гизатуллина Е.М., Пармонова К.В.,
Угрюмов В.М., Христофоров А.А.,
Гизатуллин Ш.Ф., Костюшенкова
М.Ю., Строкова О.В. (RU)

(56) WO-A1-03099300
WO-A2-0181540
US-A1-2010048863

(57) Изобретение относится к соединениям на основе нейрегулина (NRG) 4 и к способам лечения соединениями NRG4.

B1

046847

046847

B1

Настоящее изобретение относится к соединениям на основе нейрегулина (NRG) 4 и к способам лечения соединениями NRG4. Соединения NRG4 согласно настоящему изобретению предпочтительно активно связывают рецептор эпидермального фактора роста человека (HER) 4 и обладают высокой активностью, обусловленной указанным связыванием. Предпочтительные соединения NRG4 могут подходить для улучшения сердечной функции и/или лечения заболеваний, при которых связывание HER4 и определяемая этим активность играют значительную роль, таких как сердечная недостаточность (СН), включая СН со сниженной фракцией выброса (СН СФВ).

В медицине имеется неудовлетворенная потребность в разработке новых и усовершенствованных способов лечения СН. Доступные в настоящее время способы терапии предназначены для замедления прогрессирования заболевания и облегчения симптомов и основаны на гемодинамических изменениях, позволяющих снизить нагрузку на больное сердце. Указанные способы терапии включают агенты, предназначенные для: (а) снижения частоты сердечных сокращений, такие как бета-блокаторы и ивабрадин; (б) снижения кровяного давления, такие как ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (АСЕ), блокаторы рецептора ангиотензина II (АРВ), антагонисты минералокортикоидного рецептора (МРА) и сакубитрил/валсартан (ЭНТРЕСТО®); и/или (с) лечения или предотвращения перегрузки объемом, такие как мочегонные средства и МРА. Указанные способы лечения, тем не менее, не лечат непосредственно сердце и имеют практические ограничения, такие как необходимость титрования дозы и отслеживание гипотензии. Кроме того, даже с учетом наличия указанных доступных вариантов лечения все пациенты с СН, даже со слабо выраженными симптомами, подвержены высокому риску смерти. См., например, Ahmed A, A propensity matched study of New York Heart Association class and natural history end points in heart failure, AM. J. CARDIOL. 2007;99(4):549-553. Соответственно, требуются, новые и усовершенствованные способы лечения СН.

Были проведены работы по исследованию и разработке для выявления новых вариантов лечения. Например, в WO 2014/187342 представлено описание предотвращения, лечения или отсрочивания появления СН посредством пролонгированного высвобождения NRG, который, как утверждается, включает NRG1, NRG2, NRG3 и NRG4. В указанной публикации также описано клиническое исследование, задачей которого являлось изучение долговременного введения NRG-1 пациентам с хронической сердечной недостаточностью.

Тем не менее сохраняется потребность в разработке вариантов лечения с повышенной эффективностью и пониженным риском токсичности по сравнению с существующими способами терапии. Существует потребность в способах терапии, которые улучшают результаты в долгосрочной перспективе, включая повышение выживаемости и снижение числа госпитализаций. Также существует потребность в способах терапии, которые улучшают сердечную функцию и обладают потенциалом для модификации или обращения вспять заболевания по механизмам, отличным от изменения гемодинамики. Также существует потребность в способах терапии с улучшенной переносимостью, включая, в частности, лечение пациентов с сопутствующими заболеваниями, такими как гипотензия, гипокалиемия и почечная дисфункция. Также существует потребность в способах терапии, которые улучшают качество жизни (QOL) пациентов с заболеванием на поздней стадии. Настоящее изобретение нацелено на удовлетворение одной или более из указанных неудовлетворенных потребностей, имеющих критическое значение.

Соответственно, в настоящем изобретении предложены соединения NRG4, обладающие активностью, обусловленной селективным связыванием HER4. Соединения NRG4 согласно настоящему изобретению слабо связывают HER3 или не связывают его вовсе, что приводит к снижению риска токсичности и/или проблем с переносимостью, связанных с HER3.

В настоящем изобретении также предложены способы применения соединений NRG4 для лечения или предотвращения сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) и родственных состояний, включая, в частности, СН. Предпочтительные соединения NRG4 и способы согласно настоящему изобретению снижают риск смерти, связанной с ССЗ, или госпитализации, связанной с СН, снижают риск инфаркта миокарда (ИМ) или инсульта, снижают вероятность потребности в устройстве поддержки левого желудочка (УПЛЖ) или трансплантации сердца, улучшают сердечную функцию и структуру и/или облегчают симптомы и физические ограничения, связанные с СН, что приводит к улучшению качества жизни. Предпочтительные соединения NRG4 и способы могут применяться в комбинации со стандартом лечения (SoC) без необходимости титрования или отслеживания и не усиливают гипотензию, не ухудшают почечную функцию, не вызывают дисбаланс электролитов, не вносят вклад в нарушение функции печени, не повышают вероятность возникновения опухолей и/или не приводят к персистирующей гипоспермии.

В настоящем изобретении также предложены соединения NRG4, содержащие модификацию остатка D в положении 1 с заменой его на остаток G и до пяти дополнительных модификаций по сравнению с аминокислотной последовательностью NRG4 человека (SEQ ID NO: 1).

В настоящем изобретении также предложены соединения NRG4, содержащие формулу:



где: X_0 выбран из группы, состоящей из T, PT, MPT, S, GS, GGS, GGGS и (GGGGX $_n$), причем X $_n$ представляет собой Q, A, E или S, и n=1-5 (SEQ ID NO:5), или отсутствует; X_8 представляет собой E или

P; X₂₂ представляет собой Q или V; X₂₆ представляет собой F или I; X₃₅ представляет собой E или A; и X₄₄ представляет собой H, K или E (SEQ ID NO:2).

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предложен способ лечения или предотвращения СН СФВ у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения NRG4 в течение 24-96 ч.

В другом варианте реализации настоящего изобретения предложено соединение NRG4 согласно настоящему изобретению для применения в терапии.

В другом варианте реализации настоящего изобретения предложено соединение NRG4 для применения в лечении или предотвращении СН СФВ, где указанное соединение NRG4 вводят в течение 24-96 ч.

В другом варианте реализации настоящего изобретения предложено соединение NRG4 для применения в изготовлении лекарственного средства для лечения или предотвращения СН СФВ, где указанное соединение NRG4 вводят в течение 24-96 ч.

В другом варианте реализации настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединения NRG4 согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

В другом варианте реализации настоящего изобретения предложено устройство в виде помпы, содержащее соединение NRG4 согласно настоящему изобретению. В определенных вариантах реализации помпа представляет собой пластырную помпу.

NRG4 является одним из четырех членов семейства белков NRG, которые сами по себе являются частью более крупного семейства белков, называемых белками эпидермального фактора роста (EGF). Семейство белков EGF включает непосредственно EGF, а также другие белки, называемые EGF-подобными белками, которые имеют общие структурные признаки, схожие с EGF. EGF-подобные белки включают NRG1, NRG2, NRG3 и NRG4, а также связывающий гепарин EGF-подобный фактор роста (HB-EGF), трансформирующий фактор роста-а, амфирегулин (AR), эпирегулин (EPR), эпиген, бетацеллюлин (BTC) и разные изоформы указанных белков. Несмотря на то, что указанные лиганды представляют собой внеклеточные мембранные белки, разные клеточные стимулы приводят к активации клеточной металлопротеазы, что приводит к протеолитическому высвобождению домена EGF белка, который затем свободно связывает рецептор и инициирует передачу сигнала. Разные члены семейства белков EGF обладают широким спектром разнообразных эффектов, связанных с развитием, включая эффекты, связанные как с нормальным развитием, так и с патологией множества заболеваний, включая рак. Эти эффекты опосредуются взаимодействиями с подсемейством четырех рецепторных тирозинкиназ, называемым семейством рецепторов ErbB: EGFR (ErbB-1), HER2 (ErbB-2), HER3 (ErbB-3), HER4 (ErbB-4), и с изоформами указанных рецепторов. Члены семейства NRG, как таковые, обладают разными эффектами, опосредованными, в частности, взаимодействиями с EGFR, HER3 и HER4. Хотя HER2 и не связывает члены семейства NRG, HER2 усиливает нисходящую передачу сигнала, образуя гетеродимеры с EGFR, HER3 и HER4 после присоединения к ним лигандов. Таким образом, упоминание в настоящем документе активности HER3 (или HER3/2, или HER2/3) или HER4 (или HER4/2, или HER2/4) следует толковать как активность, определяемую нисходящей передачей сигнала после связывания лиганда, такого как элемент семейства NRG, либо с HER3, либо с HER4, и последующей гетеродимеризацией указанного связанного рецептора с HER2.

Как отмечалось выше, разные члены семейства NRG обладают разными эффектами, опосредованными разными профилями аффинности в отношении рецептора и активности. Например, соединения NRG1 взаимодействуют с внеклеточными доменами HER3 и HER4 и участвуют в нормальном развитии многих органов, а также в патогенезе рака. Связывание HER4 и обусловленную этим активность связывают с улучшением сердечной функции и структуры, при этом связывание HER3 и обусловленную этим активность связывают с раком, тошнотой, диареей и гепатотоксичностью. См., например, O'Shea S, Johnson K, Clark R, Sliwkowski MX, Erickson SL. Effects of in vivo heregulin betal treatment in wild type and ErbB gene-targeted mice depend on receptor levels and pregnancy. *Am J Pathol.* 2001;158(5):1871-80; Mendes-Ferreira P, De Keulenaer GW, Leite-Moreira AF, Bras-Silva C. Therapeutic potential of neuregulin-1 in cardiovascular disease. *DRUG DISCOV Today.* 2013;18(17-18):836-42. Review. NRG4, с другой стороны, связывает и активирует HER4, но демонстрирует слабое связывание или активность в отношении HER3 или не имеет их вообще.

NRG4 экспрессируется в виде белка-предшественника, содержащего 115 аминокислот, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO:3:

MPTDHEEPCG PSHKSFCLNG GLCVVIPTIP SPFCRCVENY TGARCEEVFL PGSSIQTKSN

LFEAFVALAV LVTLLIGAFY FLCRKGFQR ASSVQYDINL VETSSTSAHH SHEQH

(SEQ ID NO:3).

Экспрессированный белок представляет собой трансмембранный белок, имеющий трансмембранную область, цитоплазматическую область и внеклеточную область, которая включает область EGF, которая протеолитически высвобождается в ответ на клеточные стимулы. Соединения NRG4 согласно настоящему изобретению содержат область экспрессированного белка, описанного выше (SEQ ID NO:3),

содержащую аминокислоты с номерами 4-50, которая представляет собой внеклеточную область экспрессированного белка, такую как представлено ниже в SEQ ID NO:1:

DHEEPCGPSH KSFCLNGGLC YVIPTIPSPF CRCVENYTGARCEEVFL (SEQ ID NO:1).

Во избежание противоречий, приведенная в настоящем документе нумерация любых модификаций аминокислот в контексте соединений NRG4 согласно настоящему изобретению указана для последовательности, приведенной выше в SEQ ID NO:1.

В настоящем документе термин "соединение NRG4" обозначает белок или пептид, который содержит всю аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1 или ее часть, или ее вариант или конъюгат. В настоящем документе термин "вариант" относится к аминокислотной последовательности, содержащей одну или более модификаций в аминокислотной последовательности белка человека. Указанные модификации включают замены одной или более аминокислот в нативной последовательности человека на другую природную или не встречающуюся в природе аминокислоту и/или делецию или присоединение одной или более аминокислот в нативной последовательности человека. В настоящем документе термин "конъюгат" относится к белку или пептиду, который содержит всю SEQ ID NO:1 или ее часть, или вариант, и который присоединен к белку, пептиду или другому химическому фрагменту ковалентной связью. Указанные присоединяемые фрагменты включают, например, Fc области IgG, альбумин человека, пептиды, богатые глицином, или фрагменты жирных кислот. Кроме того, если явным образом не утверждается иное, следует понимать, что если соединение NRG4 описано в варианте реализации или указано в пункте формулы настоящего изобретения, то указанное соединение может находиться в свободной форме или в форме соли.

В настоящем изобретении предложены соединения NRG4, которые содержат формулу SEQ ID NO:1 с одной или более модификациями и имеют более высокую аффинность в отношении HER4 и активность, обусловленную связыванием HER4, по сравнению с нативным NRG4 человека, и которые по меньшей мере имеют такую же селективность связывания рецептора HER4 по сравнению с рецептором HER3, что и нативный NRG4 человека. Аффинность и активность в отношении рецепторов HER4 и HER3 могут быть определены способами, известными в данной области техники, включая те, что описаны ниже в разделе примеров. В определенных вариантах реализации соединения NRG4 согласно настоящему изобретению обладают активностью, обусловленной связыванием HER4, которая составляет по меньшей мере 50% от максимальной активности нативного домена EGF NRG1 человека. В определенных вариантах реализации соединения NRG4 согласно настоящему изобретению обладают активностью, обусловленной связыванием HER4, которая составляет вплоть до 90% от максимальной активности нативного домена EGF NRG1 человека.

В настоящем документе при описании определенных соединений NRG4 термин "не имеет активность, обусловленную связыванием HER3" обозначает соединения, у которых активность, обусловленная связыванием HER3, не превышает активность нативного NRG4 при тестировании в исследованиях *in vitro*, таких как описано ниже в примерах.

Соединения NRG4 согласно настоящему изобретению содержат одну или более модификаций в аминокислотной последовательности, представленной выше в SEQ ID NO:1, включая по меньшей мере одну замену D в положении 1 на G (т.е. D1G). Было обнаружено, что замена D1G значительно улучшает связывание с HER4 в отсутствие отрицательного влияния на селективность по сравнению с HER3, включая соединения NRG4, которые содержат дополнительные модификации по сравнению с аминокислотной последовательностью NRG4 дикого типа. Другие модификации аминокислот, для которых обнаружены благоприятные эффекты, - например, с точки зрения связывания HER4 и/или селективности по сравнению с HER3 - в комбинации с D1G в определенных предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения включают модификации при одном или более из положений 8, 22, 26, 35 и 44, включая, в частности, одну или более из следующих: P8E, V22Q, I26F, E35A, E44H и E44K. Особенно предпочтительные варианты соединений NRG4 согласно настоящему изобретению представляют собой варианты с тройными заменами, имеющие комбинацию трех аминокислотных замен, выбранную из следующего списка: D1G/I26F/E44K; D1G/I26F/P8E; D1G/I26F/E44H; и D1G/V22Q/E44K. Наиболее предпочтительный вариант соединений NRG4 согласно настоящему изобретению содержит три следующие аминокислотные замены: D1G/V22Q/E44K, как представлено в SEQ ID NO:4:

GHEEPCGPSHKS FCLNGGLCYIPTIPSPFCRCVENYTGARCEKVEFL

(SEQ ID NO:4)

Соединения NRG4 согласно настоящему изобретению также могут включать в определенных вариантах реализации одну или более аминокислот при C- или N-концах последовательности, представленной выше в SEQ ID NO:1, которые могут присутствовать в полномразмерном экспрессированном белке, представленном в SEQ ID NO:3, при условии, что включение указанных аминокислот не приводит к устранению более высокого по сравнению с нативной формой связывания и активности в отношении HER4 или селективности по сравнению с HER3.

Соединения NRG4 согласно настоящему изобретению также могут содержать в определенных вариантах реализации одну(одну) или более дополнительных аминокислот или других химических фраг-

ментов, которые отсутствуют в полноразмерном белке, представленном в SEQ ID NO:3. Например, определенные соединения NRG4 согласно настоящему изобретению конъюгированы с белком, пептидом, богатым глицином, и/или другим химическим фрагментом ковалентной связью. В определенных вариантах реализации соединения NRG4 согласно настоящему изобретению содержат пептид, богатый глицином, содержащий последовательность (GGGGX_n), где X_n представляет собой Q, A, E или S, и n=1-5 (SEQ ID NO:5). В определенных вариантах реализации соединения NRG4 согласно настоящему изобретению содержат последовательность, представленную в SEQ ID NO:5, где X_n представляет собой S, и n=1, при N-конце.

В определенных вариантах реализации соединения NRG4 согласно настоящему изобретению содержат формулу:



где: X₀ выбран из группы, состоящей из T, PT, MPT, S, GS, GGS, GGGG и (GGGGX_n), причем X_n представляет собой Q, A, E или S, и n=1-5 (SEQ ID NO:5), или отсутствует; X₈ представляет собой E или P; X₂₂ представляет собой Q или V; X₂₆ представляет собой F или I; X₃₅ представляет собой E или A; и X₄₄ представляет собой H, K или E (SEQ ID NO:2).

В определенных вариантах реализации X₈ представляет собой P; X₂₂ представляет собой V; X₂₆ представляет собой I; X₃₅ представляет собой E; и X₄₄ представляет собой E. В других вариантах реализации X₈ представляет собой E; X₂₂ представляет собой V; X₂₆ представляет собой I; X₃₅ представляет собой E; и X₄₄ представляет собой E. В других вариантах реализации X₈ представляет собой P; X₂₂ представляет собой Q; X₂₆ представляет собой I; X₃₅ представляет собой E; и X₄₄ представляет собой E. В других вариантах реализации X₈ представляет собой P; X₂₂ представляет собой V; X₂₆ представляет собой F; X₃₅ представляет собой E; и X₄₄ представляет собой E. В других вариантах реализации X₈ представляет собой P; X₂₂ представляет собой V; X₂₆ представляет собой I; X₃₅ представляет собой A; и X₄₄ представляет собой H или E. В других вариантах реализации X₈ представляет собой P; X₂₂ представляет собой V; X₂₆ представляет собой F; X₃₅ представляет собой E; и X₄₄ представляет собой K. В других вариантах реализации X₈ представляет собой P; X₂₂ представляет собой V; X₂₆ представляет собой F; X₃₅ представляет собой E; и X₄₄ представляет собой H. В других вариантах реализации X₈ представляет собой E; X₂₂ представляет собой V; X₂₆ представляет собой F; X₃₅ представляет собой E; и X₄₄ представляет собой E. В предпочтительных вариантах реализации X₈ представляет собой P; X₂₂ представляет собой Q; X₂₆ представляет собой I; X₃₅ представляет собой E; и X₄₄ представляет собой K.

В определенных вариантах реализации соединения NRG4 согласно настоящему изобретению содержат Fc область IgG. В настоящем документе термин "Fc область IgG" относится к константной области фрагмента антитела IgG человека. В частности, Fc область включает домены CH2 и CH3 константной области антитела и также может включать часть шарнирной области или всю указанную область. Fc области IgG, содержащиеся в определенных соединениях NRG4 согласно настоящему изобретению, могут содержать фрагменты константных областей любой одной тяжелой цепи антитела IgG или двух тяжелых цепей, которые ассоциированы друг с другом посредством нековалентных взаимодействий и дисульфидных связей. В настоящем документе термин "Fc область IgG" также включает формы указанных фрагментов антитела, которые являются модифицированным, удлиненным и/или усеченными, например, для изменения свойств или характеристик соединения NRG4, таких как активность и/или фармакокинетики. В Fc области IgG человека в определенных вариантах реализации настоящего изобретения также может быть частично или полностью удалена шарнирная область для упрощения димеризации Fc, опосредованной дисульфидом. Fc области IgG в определенных вариантах реализации настоящего изобретения содержат димеры двух тяжелых цепей, имеющих разные аминокислотные последовательности, которые могут быть получены способами, известными в данной области техники. См., например, Lewis SM, et al. Nat. Biotechnol. 32(2): 191-8 (2014); Carter, J. Immunol. Methods, 248(1-2):7-15 (2001); Ridgway, J. V. et al. Protein Eng. 9(7):617-2 (1996).

Одна из предпочтительных Fc областей IgG представляет собой димер двух следующих аминокислотных цепей:

ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTSKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:6); и

ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTSKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:7).

Другая предпочтительная Fc область IgG представляет собой димер двух следующих аминокислотных цепей:

ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTKSCKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNAYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:8); и

ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTKSCKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNAYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:9).

В определенных вариантах реализации, в которых соединения NRG4 согласно настоящему изобретению содержат Fc область IgG, указанная Fc область IgG присоединена при помощи линкера. В определенных вариантах реализации линкер представляет собой пептидный линкер, содержащий последовательность, представленную выше в SEQ ID NO:5 где X_n представляет собой Q, A, E или S, и n=1-5. В определенных вариантах реализации линкер содержит последовательность SEQ ID NO:5, где X_n, представляет собой S, и n равен 3. В определенных вариантах реализации, в которых соединения NRG4 согласно настоящему изобретению содержат Fc область IgG, присоединенную при помощи пептидного линкера, N-концевой остаток пептидного линкера напрямую слит с C-концевым остатком одной цепи Fc области IgG, и N-концевой остаток агониста NRG4 напрямую слит с C-концевым остатком пептидного линкера.

Включение Fc областей IgG в определенные соединения NRG4 согласно настоящему изобретению может обеспечивать преимущества, связанные с получением и/или введением. Что касается получения, то указанные соединения могут быть быстро получены способами биологической экспрессии, известными в данной области техники, такими как описано ниже в примерах. Быстрое получение указанными способами делает эффективными все фазы исследования и разработки, включая, в частности, получение вариантов NRG4 для скрининга связывания и/или активности. Что касается введения, то соединения NRG4 которые содержат Fc области IgG, могут иметь профили с длительным сохранением параметров фармакокинетики, включая уровень в сыворотке в течение периода примерно до 14 дней.

Тем не менее, несмотря на указанные преимущества, также было обнаружено, что длительное воздействие NRG4, включая сохранение в сыворотке в течение более чем примерно 8 дней, может создавать риски кардиотоксичности, что отмечено ниже в примерах. Также было обнаружено, что риск токсичности может быть уменьшен, хотя и не устранен у всех видов, путем получения соединений (например, с использованием модифицированных Fc областей) с более короткими фармакокинетическими периодами полувыведения, включая сохранение в сыворотке в течение примерно 8 дней.

Также было обнаружено, что обеспечение более краткосрочного воздействия соединений NRG4 по сравнению с 8-14-дневной продолжительностью воздействия, описанной выше, позволяет обеспечивать достаточную и продолжительную эффективность соединений NRG4 в отсутствие рисков кардиотоксичности, описанных в приведенных выше абзацах. Примеры указанной продолжительности воздействия составляют от примерно 1 до примерно 7 дней, предпочтительно 2, 3 или 4 дня. Таким образом, в определенных вариантах реализации в настоящем изобретении предложен способ лечения или предотвращения СН СФВ, где соединение NRG4 вводят в количестве, достаточном для обеспечения терапевтически эффективной концентрации в сыворотке в течение от примерно 24 до примерно 168 ч. В определенных вариантах реализации соединение NRG4 вводят в количестве, достаточном для обеспечения терапевтически эффективной концентрации в сыворотке в течение от примерно 24 до примерно 96 ч. В определенных вариантах реализации соединение NRG4 вводят в количестве, достаточном для обеспечения терапевтически эффективной концентрации в сыворотке в течение примерно 24 ч. В определенных вариантах реализации соединение NRG4 вводят в количестве, достаточном для обеспечения терапевтически эффективной концентрации в сыворотке в течение примерно 48 ч. В определенных вариантах реализации соединение NRG4 вводят в количестве, достаточном для обеспечения терапевтически эффективной концентрации в сыворотке в течение примерно 72 ч. В определенных вариантах реализации соединение NRG4 вводят в количестве, достаточном для обеспечения терапевтически эффективной концентрации в сыворотке в течение примерно 96 ч.

Продолжительность воздействия, описанная в предыдущем абзаце, может быть достигнута либо за счет обеспечения однократной инъекции болюса соединений NRG4, имеющих профиль фармакокинетики, обеспечивающий сохранение в сыворотке в течение периодов времени, описанных в предыдущем абзаце, либо путем непрерывного введения (например, с использованием помпы) быстро выводящегося соединения NRG4 в течение периодов времени, описанных в предыдущем абзаце.

В настоящем документе термин "продолжительная эффективность" относится к улучшению состояний, связанных с сердечной недостаточностью, которое сохраняется и по прошествии периода времени, в течение которого вводят соединение NRG4. Например, в определенных вариантах реализации, в которых соединение NRG4 вводят в количестве, достаточном для обеспечения терапевтически эффективной концентрации в сыворотке в течение 72 ч, эффективность указанного режима лечения может сохраняться в течение периода времени от примерно 6 дней (~2X от продолжительности введения) до при-

мерно 4 месяцев (~30X от продолжительности введения). Продолжительность сохранения эффективности (т.е. период времени, в течение которого наблюдается клиническое благоприятное действие) относительно продолжительности введения (т.е. периода времени, в течение которого обеспечивается терапевтически эффективная концентрация в сыворотке) в определенных вариантах реализации в настоящем документе определена как "отношение эффективность:введение". В определенных вариантах реализации отношение эффективность:введение составляет от примерно 2 до примерно 50. В определенных вариантах реализации отношение эффективность:введение составляет от примерно 20 до примерно 45. В определенных вариантах реализации отношение эффективность:введение составляет примерно 22, примерно 30 или примерно 45.

Указанная продолжительная эффективность позволяет относительно редко вводить соединение NRG4 в количестве, достаточном для обеспечения терапевтически эффективной концентрации в сыворотке в течение желаемого периода времени. В определенных вариантах реализации соединения NRG4 вводят раз в шесть месяцев. В определенных вариантах реализации соединения NRG4 вводят не чаще чем раз в неделю. В других вариантах реализации соединения NRG4 вводят два раза в месяц. В других вариантах реализации соединения NRG4 вводят раз в месяц. В определенных предпочтительных вариантах реализации соединения NRG4 вводят раз в квартал. В других предпочтительных вариантах реализации соединения NRG4 вводят раз в шесть месяцев.

В настоящем документе термин "лечение" или "лечить" включает ограничение, замедление, прекращение или обращение вспять прогрессирования или степени тяжести существующего симптома или нарушения. Лечение сердечной недостаточности или СН СФВ согласно настоящему изобретению может быть отражено при помощи одного или более из ряда параметров, значимых при сердечной недостаточности, включая, например: увеличение фракции выброса левого желудочка (ФВЛЖ), увеличение конечного систолического объема левого желудочка (КСОЛЖ), снижение конечного диастолического давления в левом желудочке (КДДЛЖ), снижение риска гибели от ССЗ и/или госпитализации с сердечной недостаточностью, снижение риска смерти от всех причин, снижение риска инфаркта миокарда (ИМ), снижение риска инсульта, снижение риска необходимости имплантации устройства поддержки левого желудочка (УПЛЖ) и/или трансплантации сердца, облегчение симптомов и физических ограничений при сердечной недостаточности и/или улучшение качества жизни (QoL). Определенные благоприятные эффекты лечения согласно вариантам реализации настоящему изобретению могут быть достигнуты после лечения в течение по меньшей мере 1 месяца. Определенные благоприятные эффекты лечения согласно вариантам реализации настоящему изобретению могут быть достигнуты после лечения в течение по меньшей мере 6 месяцев. Определенные благоприятные эффекты лечения согласно вариантам реализации настоящему изобретению могут быть достигнуты после лечения в течение по меньшей мере 1 года.

В определенных вариантах реализации введение соединений NRG4 согласно настоящему изобретению приводит к значительному увеличению ФВЛЖ. В определенных вариантах реализации введение соединений NRG4 согласно настоящему изобретению приводит к увеличению ФВЛЖ по меньшей мере на 5%. В определенных вариантах реализации введение соединений NRG4 согласно настоящему изобретению приводит к увеличению ФВЛЖ по меньшей мере на 5% после 6 месяцев лечения. В определенных вариантах реализации введение соединений NRG4 согласно настоящему изобретению приводит к увеличению ФВЛЖ по меньшей мере на 5% после 1 года лечения. В определенных вариантах реализации введение соединений NRG4 согласно настоящему изобретению приводит к увеличению КСОЛЖ по меньшей мере на 5% после 1 года лечения. В определенных вариантах реализации введение соединений NRG4 согласно настоящему изобретению приводит к значительному снижению КДДЛЖ после 1 года лечения. В определенных вариантах реализации введение соединений NRG4 согласно настоящему изобретению приводит к значительному снижению глобальной продольной деформации (ГПД). В определенных вариантах реализации введение соединений NRG4 согласно настоящему изобретению приводит к снижению ГПД по меньшей мере на 3,5%. В определенных вариантах реализации введение соединений NRG4 согласно настоящему изобретению приводит к снижению риска смерти от ССЗ и/или госпитализации с СН по меньшей мере на 15%. В определенных вариантах реализации введение соединений NRG4 согласно настоящему изобретению приводит к значительному снижению риска одного или более из: смерти от всех причин, ИМ, инсульта, имплантации УПЛЖ или трансплантации сердца. В определенных вариантах реализации введение соединений NRG4 согласно настоящему изобретению приводит к значительному облегчению симптомов и физических ограничений при сердечной недостаточности и/или к улучшению качества жизни.

Кроме того, как отмечалось выше, введение соединений NRG4 согласно определенным вариантам реализации изобретения позволяет обеспечивать улучшение параметров, связанных с сердечной недостаточностью, таких как описано выше, в отсутствие повышения рисков для безопасности. Таким образом, в предпочтительных вариантах реализации введение соединений NRG4 согласно настоящему изобретению не приводит к повышению рисков для безопасности, таких как усиление гипотензии; ухудшение почечной функции; нарушение баланса электролитов; нарушение функции печени; возникновение опухолей или персистирующей гипоспермии.

В настоящем документе термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству

или дозе соединения NRG4, которое(-ая) обеспечивает желаемый эффект у пациента. В случае соединений NRG4, имеющих профили с продолжительным сохранением параметров фармакокинетики, указанная доза может представлять собой количество, которое вводят в виде одной или нескольких доз. В случае соединений ускоренного действия, вводимых в течение периода времени, например, путем 24-96-часовой инфузии, как описано выше, доза или количество может быть выражена(-о) как общая масса соединения NRG4, вводимого за указанный период времени, например, общая масса в мг, или как скорость, с которой соединение NRG4 вводят в течение указанного периода времени, например, мг/мин, или как концентрация в плазме соединения NRG4 в течение периода введения. Эффективное количество может быть легко определено специалистами в данной области техники известными способами и путем наблюдения результатов, полученных в аналогичных условиях. В определенных вариантах реализации дозировки при введении раз в квартал могут попадать в диапазон дозировок, достаточных для обеспечения концентраций в плазме от примерно 3 до примерно 100 нМ в течение периода введения.

Соединения NRG4 согласно настоящему изобретению, как правило, вводят парентерально, например, внутривенно (ВВ), подкожно (ПК) или интраперитонеально (ИП). Таким образом, в определенных вариантах реализации настоящего изобретения соединения NRG4 вводят внутривенно. В других вариантах реализации настоящего изобретения соединения NRG4 вводят интраперитонеально. В других вариантах реализации соединения NRG4 вводят подкожно.

Для контролирования длительности воздействия для оптимизации и продления эффективности с достаточным запасом до появления кардиотоксичности парентеральное введение соединений NRG4 предпочтительно проводят путем непрерывной или периодической инфузии. Например, множество типов инфузионных помп применяют для вливания широкого спектра лекарственных препаратов, и указанные помпы можно применять для введения соединений NRG4 согласно настоящему изобретению. Совсем недавно были разработаны пластырные помпы, которые меньше традиционных устройств и прикрепляются непосредственно на кожу пациента, что в минимальной степени нарушает его повседневную деятельность. Таким образом, в определенных вариантах реализации соединения NRG4 вводят при помощи инфузионной помпы или пластырной помпы. Предпочтительно, соединения NRG4 вводят при помощи пластырной помпы.

В настоящее изобретение также включены новые промежуточные соединения и способы, подходящие для получения соединений NRG4 согласно настоящему изобретению. Промежуточные соединения и соединения NRG4 согласно настоящему изобретению могут быть получены разнообразными способами, известными в данной области техники, включая способы с использованием химического синтеза или биологической экспрессии, такие как описано ниже в разделе примеров.

Что касается химического синтеза, то конкретные стадии синтеза в каждом из описанных способов могут быть объединены различным образом для получения соединений NRG4 согласно настоящему изобретению. Реагенты и исходные вещества легко доступны специалистам обычной квалификации в данной области техники.

Что касается биологической экспрессии, то соединения могут быть экспрессированы в клетке хозяина после функционального связывания последовательностей с последовательностью контроля экспрессии. Соединения могут быть легко получены в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO, NSO, HEK293, ВНК или COS; в бактериальных клетках, таких как *E. coli*, *Bacillus subtilis* или *Pseudomonas fluorescens*; в клетках насекомых или в клетках грибов или дрожжей, которые культивируют способами, известными в данной области техники. Векторы, содержащие представляющие интерес полинуклеотидные последовательности, могут быть перенесены в клетку хозяина хорошо известными способами, которые варьируются в зависимости от типа хозяина клетки. Можно применять разные способы очистки белков, и указанные способы известны в данной области техники.

Как отмечалось выше, все пациенты с СН, даже со слабо выраженными симптомами, подвержены высокому риску смерти. Таким образом, в настоящем документе упоминания "пациента, нуждающегося" в лечении сердечной недостаточности (СН), могут относиться к широкому спектру индивидуумов, страдающих от СН, включая индивидуумов с заболеванием с широким диапазоном степеней тяжести, таким как описано ниже. Нью-Йоркская кардиологическая ассоциация (NYHA) предложила схему классификации степени или тяжести СН, которая кратко изложена ниже в табл. 1:

Таблица 1

Класс NYHA	Симптомы
I	Ограничения физических нагрузок отсутствуют. Обычные физические нагрузки не вызывают чрезмерную утомляемость, учащенное сердцебиение, одышку (затруднение дыхания).
II	Незначительное ограничение физических нагрузок. Комфорт в состоянии покоя. Обычные физические нагрузки вызывают усталость, учащенное сердцебиение, одышку (затруднение дыхания).
III	Выраженное ограничение физических нагрузок. Комфорт в состоянии покоя. Небольшие нагрузки вызывают усталость, ощущение сердцебиения или одышку.
IV	Невозможность выполнения любых физических упражнений без дискомфорта. Симптомы сердечной недостаточности в состоянии покоя. При выполнении любых физических упражнений дискомфорт усиливается.

В определенных вариантах реализации пациент, нуждающийся в лечении, страдает от сердечной недостаточности класса II-IV по NYHA. В определенных вариантах реализации пациент, нуждающийся в лечении, страдает от сердечной недостаточности класса II по NYHA. В определенных вариантах реализации пациент, нуждающийся в лечении, страдает от сердечной недостаточности класса III по NYHA. В определенных вариантах реализации пациент, нуждающийся в лечении, страдает от сердечной недостаточности класса IV по NYHA. В определенных вариантах реализации пациент, нуждающийся в лечении, страдает от сердечной недостаточности класса II-III по NYHA.

Как отмечалось выше, существующие варианты терапевтического лечения сердечной недостаточности, включая существующий стандарт лечения, облегчают симптомы и замедляют прогрессирование заболевания по гемодинамическим механизмам - например, снижая кровяное давление, частоту сердечных сокращений и/или объем плазмы, - для снижения рабочей нагрузки на большое сердце. Соединения NRG4 согласно настоящему изобретению, напротив, осуществляют свое действие по другому механизму, а именно, путем селективного связывания HER4 и обусловленной этим активности, что напрямую улучшает выживаемость кардиомиоцитов и клеточный метаболизм и способствует восстановлению миокарда. Благодаря указанным отличающимся механизмам действия соединения NRG4 согласно настоящему изобретению можно вводить в дополнение к существующему SoC, не проводя титрование или отслеживание. Таким образом, в определенных вариантах реализации соединения NRG4 согласно настоящему изобретению можно вводить в комбинации с одним или более дополнительными способами лечения сердечной недостаточности. В определенных вариантах реализации один или более дополнительных способов лечения сердечной недостаточности выбраны из группы, состоящей из бета-блокаторов, ингибиторов ACE, ARB, MRA, мочегонных средств, ивабрадина и сакубитрила/валсартана (ЭНТРЕСТО®). В определенных вариантах реализации соединения NRG4 согласно настоящему изобретению можно вводить в комбинации с ингибиторами SGLT2 или активаторами sGC.

Соединения NRG4 согласно настоящему изобретению также можно применять в лечении других заболеваний или состояний, включая, но не ограничиваясь указанными, сердечную недостаточность с сохраненной фракцией выброса (СНсФВ), другие сердечные нарушения или состояния, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, синдром раздраженного кишечника, нарушения костной системы, заболевание почек, диабет, метаболическое заболевание, неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП) и неалкогольный стеатогепатит (НАСГ).

Дополнительные варианты реализации описаны ниже.

Соединение NRG4, содержащее модификацию остатка D в положении 1 с заменой его на остаток G и до пяти дополнительных модификаций по сравнению с аминокислотной последовательностью NRG4 человека (SEQ ID NO:1).

Соединение NRG4 согласно предшествующему варианту реализации, имеющее не более 4 дополнительных модификаций. В одном из вариантов реализации соединение NRG4 имеет не более 3 дополнительных модификаций. В одном из вариантов реализации соединение NRG4 имеет не более 2 дополнительных модификаций.

Соединение NRG4 согласно любому из описанных выше вариантов реализации, отличающееся тем, что указанное соединение включает по меньшей мере одну модификацию в положении, выбранном из группы, состоящей из 8, 22, 26, 35 и 44.

Соединение, содержащее формулу:



где: X_0 выбран из группы, состоящей из T, PT, MPT, S, GS, GGS, GGGS и (GGGGX λ) $_n$, причем X_λ представляет собой Q, A, E или S, и $n=1-5$ (SEQ ID NO:5), или отсутствует; X_8 представляет собой E или P; X_{22} представляет собой Q или V; X_{26} представляет собой F или I; X_{35} представляет собой E или A; и X_{44} представляет собой H, K или E (SEQ ID NO:2).

Соединение согласно приведенному выше варианту реализации, отличающееся тем, что X_8 пред-

ставляет собой P; X₂₂ представляет собой V; X₂₆ представляет собой I; X₃₅ представляет собой E; и X₄₄ представляет собой E.

Соединение согласно любому из описанных выше вариантов реализации, отличающееся тем, что X₈ представляет собой E; X₂₂ представляет собой V; X₂₆ представляет собой I; X₃₅ представляет собой E; и X₄₄ представляет собой E.

Соединение согласно любому из описанных выше вариантов реализации, отличающееся тем, что X₈ представляет собой P; X₂₂ представляет собой Q; X₂₆ представляет собой I; X₃₅ представляет собой E; и X₄₄ представляет собой E.

Соединение согласно любому из описанных выше вариантов реализации, отличающееся тем, что X₈ представляет собой P; X₂₂ представляет собой V; X₂₆ представляет собой F; X₃₅ представляет собой E; и X₄₄ представляет собой E.

Соединение согласно любому из описанных выше вариантов реализации, отличающееся тем, что X₈ представляет собой P; X₂₂ представляет собой V; X₂₆ представляет собой I; X₃₅ представляет собой A; и X₄₄ представляет собой H или E.

Соединение согласно любому из описанных выше вариантов реализации, отличающееся тем, что X₈ представляет собой P; X₂₂ представляет собой V; X₂₆ представляет собой F; X₃₅ представляет собой E; и X₄₄ представляет собой K.

Соединение согласно любому из описанных выше вариантов реализации, отличающееся тем, что X₈ представляет собой P; X₂₂ представляет собой V; X₂₆ представляет собой F; X₃₅ представляет собой E; и X₄₄ представляет собой H.

Соединение согласно любому из описанных выше вариантов реализации, отличающееся тем, что X₈ представляет собой E; X₂₂ представляет собой V; X₂₆ представляет собой F; X₃₅ представляет собой E; и X₄₄ представляет собой E.

Соединение согласно любому из описанных выше вариантов реализации, отличающееся тем, что X₈ представляет собой P; X₂₂ представляет собой Q; X₂₆ представляет собой I; X₃₅ представляет собой E; и X₄₄ представляет собой K.

Соединение согласно предшествующему варианту реализации, отличающееся тем, что X₀ представляет собой SEQ ID NO:5, где X_n представляет собой S, и n=1.

Соединение, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4.

Соединение, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10.

Соединение, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11.

Соединение, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.

Соединение, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13.

Соединение, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14.

Соединение, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15.

Соединение, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16.

Соединение, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17.

Соединение, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18.

Соединение, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19.

Соединение, состоящее из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:18.

Соединение согласно любому из предшествующих вариантов реализации, отличающееся тем, что указанное соединение присоединено к белку, пептиду или другому химическому фрагменту ковалентной связью. Соединение согласно любому из предшествующих вариантов реализации, отличающееся тем, что указанное соединение присоединено к одному или более из Fc области IgG, альбумина человека, пептида, богатого глицином, или фрагмента жирной кислоты. Соединение согласно любому из предшествующих вариантов реализации, отличающееся тем, что указанное соединение присоединено к Fc области IgG. Соединение согласно предшествующему варианту реализации, отличающееся тем, что Fc область IgG содержит димер либо SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:7, либо SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:9. Соединение согласно предшествующим вариантам реализации, отличающееся тем, что X₀ представляет собой SEQ ID NO:5, где X_n представляет собой S, и n=3.

Соединение согласно любому из приведенных выше вариантов реализации, отличающееся тем, что указанное соединение имеет активность, обусловленную связыванием HER4, которая превышает активность нативного NRG4 человека.

Соединение согласно любому из приведенных выше вариантов реализации, отличающееся тем, что указанное соединение имеет активность, обусловленную связыванием HER4, которая составляет по меньшей мере 50% от максимальной активности нативного NRG1 человека.

Соединение согласно любому из приведенных выше вариантов реализации, отличающееся тем, что указанное соединение имеет активность, обусловленную связыванием HER4, которая составляет по меньшей мере 70% от максимальной активности нативного NRG1 человека.

Соединение согласно любому из приведенных выше вариантов реализации, отличающееся тем, что указанное соединение имеет активность, обусловленную связыванием HER4, которая составляет по

меньшей мере 90% от максимальной активности нативного NRG1 человека.

Соединение согласно любому из приведенных выше вариантов реализации, отличающееся тем, что указанное соединение не имеет активности, обусловленной связыванием HER3.

Фармацевтическая композиция, содержащая соединение согласно любому из приведенных выше вариантов реализации.

Устройство в виде помпы, содержащее соединение согласно любому из приведенных выше вариантов реализации.

Способ лечения или предотвращения СН у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения NRG4. В одном из вариантов реализации соединение NRG4 представляет собой соединение согласно любому из приведенных выше вариантов реализации.

Соединение NRG4 для применения в лечении или предотвращении СН СФВ. В одном из вариантов реализации соединение NRG4 представляет собой соединение согласно любому из приведенных выше вариантов реализации.

Соединение NRG4 для применения в получении лекарственного средства для лечения или предотвращения СН СФВ. В одном из вариантов реализации соединение NRG4 представляет собой соединение согласно любому из приведенных выше вариантов реализации.

В одном из вариантов реализации соединение вводят в течение 24-168 ч. В одном из вариантов реализации соединение вводят в течение 24-96 ч. В одном из вариантов реализации соединение вводят в течение 24, 48, 72 или 96 ч. В одном из вариантов реализации соединение вводят в течение 96 ч.

В одном из вариантов реализации соединение вводят не чаще чем раз в месяц. В одном из вариантов реализации соединение вводят не чаще чем раз в квартал (Q3M). В одном из вариантов реализации соединение вводят Q3M. В одном из вариантов реализации соединение вводят Q3M в течение 96 ч. В одном из вариантов реализации соединение вводят раз в шесть месяцев.

В одном из вариантов реализации отношение эффективность:введение составляет от примерно 2 до примерно 50. В одном из вариантов реализации отношение эффективность:введение составляет от примерно 20 до примерно 45. В одном из вариантов реализации отношение эффективность:введение составляет примерно 22, примерно 30 или примерно 45.

В одном из вариантов реализации лечение продолжают в течение по меньшей мере 6 месяцев.

В одном из вариантов реализации лечение продолжают в течение по меньшей мере 1 года.

В одном из вариантов реализации соединение приводит к значительному увеличению ФВЛЖ. В одном из вариантов реализации соединение приводит к увеличению ФВЛЖ по меньшей мере на 5%. В одном из вариантов реализации соединение приводит к улучшению ФВЛЖ по меньшей мере на 5% после 1 года лечения.

В одном из вариантов реализации соединение приводит к значительному увеличению КСОЛЖ. В одном из вариантов реализации соединение приводит к улучшению КСОЛЖ по меньшей мере на 5%. В одном из вариантов реализации соединение приводит к улучшению КСОЛЖ по меньшей мере на 5% после 1 года лечения.

В одном из вариантов реализации соединение приводит к значительному снижению КДДЛЖ. В одном из вариантов реализации соединение приводит к значительному снижению КДДЛЖ после 1 года лечения.

В одном из вариантов реализации соединение приводит к значительному снижению глобальной продольной деформации (ГПД). В одном из вариантов реализации соединение приводит к снижению ГПД по меньшей мере на 3,5%.

В одном из вариантов реализации соединение приводит к значительному увеличению конечно-диастолического объема левого желудочка (КДОЛЖ).

В одном из вариантов реализации соединение приводит к значительному снижению риска смерти от ССЗ и/или госпитализации с СН.

В одном из вариантов реализации соединение приводит к снижению риска смерти от ССЗ по меньшей мере на 15%.

В одном из вариантов реализации соединение приводит к снижению риска госпитализации с СН по меньшей мере на 15%.

В одном из вариантов реализации соединение приводит к значительному снижению риска одного или более из: смерти от всех причин, ИМ, инсульта, имплантации УПЛЖ или трансплантации сердца.

В одном из вариантов реализации соединение приводит к значительному облегчению симптомов и физических ограничений при сердечной недостаточности и/или к улучшению качества жизни.

В одном из вариантов реализации соединение не приводит к: усилению гипотензии; ухудшению почечной функции; нарушению баланса электролитов; нарушению функции печени; возникновению опухоли или персистирующей гипоспермии.

В одном из вариантов реализации соединение вводят парентерально.

В одном из вариантов реализации соединение вводят внутривенно, подкожно или интраперитонеально.

В одном из вариантов реализации соединения вводят при помощи инфузионной помпы.

В одном из вариантов реализации соединения вводят при помощи пластырной помпы.

В одном из вариантов реализации терапевтически эффективное количество представляет собой количество соединения, которое обеспечивает концентрацию в сыворотке от примерно 3 до примерно 100 нМ.

В одном из вариантов реализации соединения вводят пациенту с сердечной недостаточностью класса II-IV по NYHA.

В одном из вариантов реализации соединения вводят пациенту с сердечной недостаточностью класса II-III по NYHA.

В одном из вариантов реализации соединения вводят одновременно или последовательно в комбинации с одним или более дополнительными способами лечения сердечной недостаточности. В одном из вариантов реализации один или более дополнительных способов лечения сердечной недостаточности выбраны из группы, состоящей из бета-блокаторов, ингибиторов ACE, ARB, MRA, мочегонных средств, ивабрадина и сакубитрила/валсартана (ЭНТРЕСТО®). В одном из вариантов реализации соединения вводят одновременно или последовательно в комбинации с ингибитором SGLT2 и/или активатором sGC.

В одном из вариантов реализации вводимое соединение NRG4 представляет собой соединение NRG4 согласно настоящему изобретению.

Изобретение дополнительно проиллюстрировано в следующих примерах, которые не следует рассматривать как ограничивающие.

Получение предложенных соединений.

Примеры соединений NRG4 согласно настоящему изобретению описаны ниже в табл. 2.

Таблица 2

Компоненты предложенных соединений NRG4

Пример	Модификации NRG4	N-концевые АК / линкер	№ последовательности
1	D1G	SEQ ID NO:5, где Xλ представляет собой S, и n равен 3	SEQ ID NO:10
2	D1G/P8E	SEQ ID NO:5, где Xλ представляет собой S, и n равен 3	SEQ ID NO:11
3	D1G/V22Q	SEQ ID NO:5, где Xλ представляет собой S, и n равен 3	SEQ ID NO:12
4	D1G/I26F	SEQ ID NO:5, где Xλ представляет собой S, и n равен 3	SEQ ID NO:13
5	D1G/E35A	SEQ ID NO:5, где Xλ представляет собой S, и n равен 3	SEQ ID NO:14
6	D1G/I26F/E44K	SEQ ID NO:5, где Xλ представляет собой S, и n равен 3	SEQ ID NO:15
7	D1G/I26F/E44H	SEQ ID NO:5, где Xλ представляет собой S, и n равен 3	SEQ ID NO:16
8	D1G/I26F/P8E	SEQ ID NO:5, где Xλ представляет собой S, и n равен 3	SEQ ID NO:17
9	D1G/V22Q/E44K	SEQ ID NO:5, где Xλ представляет собой S, и n равен 1	SEQ ID NO:18
10	D1G/V22Q/E44K	SEQ ID NO:5, где Xλ представляет собой S, и n равен 3	SEQ ID NO:19
11	D1G/V22Q/E44K	SEQ ID NO:5, где Xλ представляет собой S, и n равен 3	SEQ ID NO:19

Полные аминокислотные последовательности предложенных соединений, за исключением любых последовательностей Fc области IgG, указаны как SEQ ID NO, перечисленные в четвертом столбце. Примеры 1-8 и 10-11 дополнительно содержат Fc области IgG. Fc области IgG в примерах 1-8 и 10 содержат димер SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:7, где N-концевая аминокислота в последовательности, указанной в третьем столбце приведенной выше таблицы, слита с C-концевой аминокислотой в SEQ ID NO:7. Fc область IgG в примере 11 содержит димер SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:9, где N-концевая аминокислота в последовательности, указанной в третьем столбце приведенной выше таблицы, слита с C-концевой аминокислотой в SEQ ID NO:9.

Биологическая экспрессия.

Примеры соединений NRG4, содержащих Fc области, получали в экспрессирующей системе клеток млекопитающих с использованием клеточной линии CHO GSKO. Нокаут гена GS обеспечивает узкие и жесткие условия отбора благодаря устранению фоновой активности эндогенного GS, что может способствовать выживанию низкопродуктивных или непродуктивных клеток в условиях отбора. Гены, кодирующие выступающую цепь ("knob chain") и углубленную цепь ("hole chain") при слиянии Fc, согласно настоящему изобретению могут быть субклонированы в отдельные экспрессирующие плазмиды, содержащие глутаминсинтетазу (GS), для совместной трансфекции, или же обе цепи могут быть субклониро-

ваны в одну экспрессирующую плазмиду, содержащую GS. В качестве альтернативы, выступающие цепи и углубленные цепи в разных отношениях могут быть объединены в одной экспрессирующей плазмиде, содержащей GS, если не требуется изменение относительных уровней экспрессии каждой цепи. Последовательность кДНК, кодирующую выступающую цепь или углубленную цепь, гибридизуют в рамке с кодирующей последовательностью сигнального пептида, которая может представлять собой лидерную последовательность каппа-цепи мышей, для усиления секреции целевого продукта в питательную клеточную среду. Экспрессия регулируется вирусным промотором цитомегаловируса (CMV).

Можно проводить временную или стабильную трансфекцию клеток CHO GSKO. Для стабильной трансфекции трансфицировали клетки CHO GSKO путем электропорации с использованием соответствующих количеств рекомбинантных экспрессирующих плазмид с выступающими цепями и углубленными цепями, и выдерживали трансфицированные клетки в суспензионной культуре при достаточной плотности клеток. Трансфицированные клетки отбирали путем выращивания в не содержащей глутамин и содержащей 25 мкМ сульфоксимины метионина (MSX) бессывороточной среде и инкубации при 32-37°C и 5-7% CO₂. Fc-гибридные белки секретируются в среду из клеток CHO.

Очищали белки путем либо: (1) аффинной хроматографии с протеином А и последующей катионообменной хроматографии или хроматографии гидрофобных взаимодействий (или другими подходящими способами); либо (2) мультимодальной хроматографии и последующей хроматографии гидрофобных взаимодействий (или другими подходящими способами).

Для очистки с использованием сначала хроматографии с протеином А наносили белки из собранной среды на смолу с протеином А MabSelect SuRe Protein A (GE Healthcare). Затем быстро промывали смолу рабочим буфером, таким как фосфатный буферный раствор (ФБР), pH 7,4, или рабочим буфером, содержащим Tris, для удаления неспецифически связанного материала. Затем элюировали белок из смолы раствором с низким pH, таким как 20 мМ уксусная кислота/5 мМ лимонная кислота. Объединяли фракции, содержащие Fc-гибридный белок. При необходимости увеличивали pH, добавляя основание, такое как 0,1М Tris, pH 8,0. На данной стадии Fc-гибридные белки можно применять для скрининга связывания/активности, или же, при желании, их можно дополнительно очищать путем хроматографии гидрофобных взаимодействий с использованием смол, таких как фенил-сефароза HP. Fc-гибридные белки можно элюировать из колонки с фенил-сефарозой HP с градиентом от 500 мМ до 0 мМ сульфата натрия в 10 мМ фосфате натрия, pH 7, с использованием 10 объемов колонки. Fc-гибридные белки могут быть дополнительно очищены путем гельпроникающей хроматографии на колонке Superdex 200 (GE Healthcare) при изократическом элюировании в ФБР, pH 7,4, или в буфере, замененном на желаемый буфер. Примеры 1-8 и 10 очищали указанным способом.

Для очистки с использованием сначала мультимодальной хроматографии наносили белки из собранной среды на смолу CaptoMMC (GE Healthcare). Затем быстро промывали смолу 100 мМ цитратом, pH 5,0 (буфер "А"), а затем 80%/20% промывочным раствором буфера "А" и 25 мМ фосфата натрия, 1 М хлорида натрия, pH 7,5 (буфер "В"). Затем элюировали целевой белок из смолы с использованием 70% буфера "В". Fc-гибридные белки могут быть дополнительно очищены путем хроматографии гидрофобных взаимодействий с использованием смол, таких как фенил-сефароза HP (GE Healthcare). Fc-гибридные белки можно элюировать из колонки с фенил-сефарозой HP с линейным градиентом от 800 мМ до 0 мМ сульфата натрия в 20 мМ Tris, pH 8. Fc-гибридные белки могут быть дополнительно очищены путем ионообменной хроматографии на колонке с сефарозой Q (GE Healthcare). Fc-гибридные белки можно элюировать из колонки с градиентом от 0 М до 1 М хлорида натрия в 20 мМ Tris, pH 8. Объединяли фракции и заменяли буфер на желаемый буфер для хранения. Пример 11 очищали указанным способом.

Химический синтез.

Соединения NRG4 согласно настоящему изобретению, которые представляют собой пептиды, не содержащие Fc области IgG (например, пример 9 в приведенной выше табл. 2), также могут быть получены путем твердофазного синтеза пептидов с использованием стратегии Fmoc/t-Bu. Синтезировали пептиды на автоматическом синтезаторе пептидов SymphonyX (PTI Protein Technologies Inc.).

Для синтеза пептидов применяли смолу Fmoc-L-Leu-Wang (0,3-0,8 ммоль/грамм, 200-400 меш, Chem-Imprex). Удаление защитных Fmoc-групп проводили с использованием 20% (об./об.) раствора пиперидина в ДМФА. Сочетание аминокислот проводили с использованием 10 эквивалентов Fmoc-аминокислоты, 0,9 М диизопропилкарбодиимида (DIC) и 0,9 М Охума (мольное отношение 1:1:1) в ДМФА в течение 2 ч при 25°C.

Стадии промывки в ДМФА проводили после каждой стадии сочетания и удаления защитных групп. Дополнительные подробности приведены ниже в табл. 3.

Таблица 3

Протокол удаления защитных Fmoc-групп и сочетания

Стадия	Растворитель/процедура	Время смешения	Повторы
1	ДМФА	00:01:00	2
2	25% пиперидин/ДМФА	00:10:00	3
3	ДМФА	00:01:00	1
4	ДМФА	00:01:00	5
5	Метиленхлорид	00:01:00	1
6	Метиленхлорид	00:00:02	1
7	Реагент (аминокислота)	00:00:01	1
8	0,9 М Охума в ДМФА	00:00:01	1
9	0,9 М DIC в ДХМ	03:00:00	1
10	ДМФА	00:01:00	3

Все аминокислоты, применяемые в основной последовательности, представляют собой L-аминокислоты: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH.

После завершения наращивания пептидной цепи на смоле, описанного выше, удаляли последнюю группу Fmoc и промывали смолу метиленхлоридом, после чего проводили обработку для отщепления пептида. Добавляли 1,5 мл раствора воды, триизопропилсилана, тиоанизола, 1,2-этандитиола (1:1:1) в 13 мл трифторуксусной кислоты (ТФУК) и добавляли полученный коктейль для отщепления в смолу и перемешивали в течение 2,5 ч в реакционном шприце. Переносили раствор ТФУК, содержащий отщепленный пептид, в 50 мл коническую пробирку, содержащую холодный диэтиловый эфир. Центрифугировали раствор с осажденным пептидом до получения густого осадка и декантировали эфир. Дважды повторяли осаждение в эфире для промывки от остаточного коктейля, после чего проводили повторную укладку.

Растворяли неочищенный пептид в воде и при необходимости добавляли ацетонитрил. Доводили концентрацию неочищенного пептида до 2,5-3 мг/мл (200 мл) в ацетонитриле и воде. Затем непосредственно проводили повторную укладку в образце. Готовили буфер для повторной укладки, добавляя окисленный глутатион и восстановленный глутатион при отношении GSSG:GSH (2 мМ:1 мМ) в 0,1 М буфер Tris, pH 8. Добавляли раствор неочищенного пептида в буфер для повторной укладки до достижения концентрации 0,13-0,15 мг/мл (20-кратное разбавление) и выдерживали смесь для повторной укладки при 4°C без перемешивания. Через 1 день гасили смесь для повторной укладки путем добавления ТФУК до 0,2% концентрации, доводя pH до 3,0. После гашения фильтровали и очищали раствор.

Помещали раствор пептида в колонку для ВЭЖХ, а затем устанавливали равновесие с использованием буфера А, после чего начинали градиентное элюирование. Буфер А: 0,1% ТФУК в воде; буфер В: 100% ацетонитрил. Градиент: от 10% В до 25% В в течение 100 мин. Расход: 18 мл/мин; детектирование при 220 нм (детектор Waters 2489). Колонка: колонка Waters Symmetry Prep C18, 7 мкм, 19×300 мм (Waters Part, кат.№ WAT066245). Фракции автоматически отслеживали УФ-детектором и собирали с использованием коллектора фракций Waters Fraction Collector III.

Объединяли собранные фракции, содержащие целевой пептид, и лиофилизировали.

Исследования *in vitro*.

Исследование связывания HER4/NRG-Fc для скрининга вариантов NRG4 в отношении улучшенного связывания.

Проводили исследование связывания для высокопроизводительного скрининга вариантов Fc-гибридных белков NRG4 Fc в отношении рецептора HER4 для идентификации обладающих аффинностью вариантов, имеющих потенциал для усиления активации рецептора и передачи сигнала. В планшеты для ELISA наносили покрытие 2 мкг/мл меченого антитела к His в ФБР для ускорения стандартизированного захвата конструктора внеклеточного домена (ECD) рецептора HER4 с C-концевой His-меткой после блокирования планшета 1% БСА/ФБР/0,1% Tween 20 (HER4 ECD в концентрации 5 мкг/мл). Инкубировали насыщающие количества неочищенных вариантов NRG4-Fc в среде для экспрессии (начальная концентрация 10 мкг/мл, проводили последовательные разбавления в 1% БСА/ФБР/0,1% Tween 20) с захваченным рецептором в течение 1 ч. После промывки колориметрически детектировали связанный вариант NRG4-Fc с использованием вторичного детектирующего реагента в виде конъюгата античеловеческого Fc-специфического антитела с щелочной фосфатазой для количественной оценки связывания. Продолжительность инкубации варианта для связывания с рецептором или продолжительность последующих стадий промывки изменяли для дополнительной идентификации связывающих вариантов по аффинности на основании скоростей ассоциации и диссоциации, соответственно. В указанном способе скрининга показано, что модификация DIG, такая как включена в примере 1, имеет высокую аффинность и обладает потенциалом для усиления активации рецептора и передачи сигнала, что подтверждается данными, приведенными ниже в табл. 4.

Таблица 4

Связывание с внеклеточным доменом HER4

Доза №	Пример 1		NRG1 дикого типа		NRG4 дикого типа	
	доза (мкг/мл)	О.П. 405	доза (мкг/мл)	О.П. 405	доза (мкг/мл)	О.П. 405
1	10,65	1,485	10	1,501	17	0,651
2	5,325	1,438	5	1,439	8,5	0,597
3	2,6625	1,4	2,5	1,399	4,25	0,485
4	1,33125	1,332	1,25	1,31	2,125	0,347
5	0,665625	1,217	0,625	1,27	1,0625	0,224
6	0,332813	1,081	0,3125	1,022	0,53125	0,154
7	0,166406	0,865	0,15625	0,8	0,265625	0,111
8	0,083203	0,607	0,078125	0,514	0,132813	0,088
9	0,041602	0,404	0,039063	0,316	0,066406	0,071
10	0,020801	0,235	0,019531	0,179	0,033203	0,07
11	0,0104	0,136	0,009766	0,114	0,016602	0,066
12	0,0052	0,096	0,004883	0,084	0,008301	0,066

Как видно из табл. 4, пример 1, который включает модификацию DIG, имеет схожий профиль связывания HER4 по сравнению с NRG1 дикого типа в схожих дозах и значительно улучшенный профиль связывания HER4 по сравнению с NRG4 дикого типа в схожих дозах в данном исследовании.

Подготовка клеточных линий CHO HER2-4 и HER2-3 человека и крысы.

Проводили клеточное исследование с использованием клеток CHO-K1 с повышенной экспрессией рецепторов HER человека или крысы для определения активности соединений NRG4. Выращивали клетки CHO-K1 (ATCC) в DMEM-F12 3:1с 5% ЭБС и 20 мМ HEPES, 40 мкг/мл L-пролина, 1х антибиотиков и разбавляли 1:5 каждые 2-3 дня с использованием TriPLE Express (Gibco). Трансфицировали клетки плазмидной ДНК, кодирующей пары рецепторов HER (hHER2-3, hHER2-4, rHER2-3 и rHER2-4), с использованием Eugene 6 (Promega) согласно инструкциям производителя. HER2 был включен в исследование, так как данный рецептор не связывает лиганд, но является предпочтительным партнером для димеризации рецепторов HER для нисходящей передачи сигнала. Отбирали трансфицированные клетки с использованием пурамицина (12 мкг/мл) и гигромицина (1 мг/мл) в течение 3-4 недель и получали клональные линии путем клонирования способом предельных разведений в 96-луночных планшетах. Отбирали клональные линии по надлежащей экспрессии генов HER2, HER3 или HER4 способом Taqman. Надлежащую экспрессию рецептора в линиях подтверждали по ответам фосфо-ERK ^{1/2}, индуцированным NRG1. Выращивали клоны, собирали, отбирали аликвоты в криопробирки, а затем замораживали в жидком азоте для долгосрочного хранения.

Скрининг молекул по фосфорилированию ERK 1/2, опосредованному HER2-HER4 человека in vitro.

Проводили исследование активности фосфо-ERK1/2 для определения активности соединений NRG4. Анализировали активность примеров 1-8 и 10 по сравнению с диким типом NRG1 человека и/или NRG4 человека в исследованиях, в которых измеряли стимуляцию фосфорилирования ERK 1/2, опосредованного HER2-HER4 человека. В исследование была включена линия CHO-K1, стабильно экспрессирующая HER2 и HER4 человека. Традиционным способом выращивали клетки CHO-hHER2-hHER4 (клон 1H6) в DMEM: F12(3:1), 5% ЭБС, 40 мкг/мл L-пролина, 10 мкг/мл пурамицина и 1 мг/мл гигромицина при 37°C, 5% CO₂. Дважды промывали клетки 1X ФБР, проводили диссоциацию в 0,05% трипсине/0,53 мкМ ЭДТА и собирали путем центрифугирования при 300xg в течение 10 мин. Повторно суспендировали клетки в поддерживающей среде. Высеивали 20000 клеток/лунка в 30 мкл в 384-луночные планшеты для клеточных культур с покрытием поли-D-лизина (Greiner, кат.№ 781946). Накрывали планшеты крышками от производителя и помещали в выдерживаемый при 37°C инкубатор тканевых культур при 5%CO₂, 80%+ влажности и оставляли для адгезии. Через 24 ч удаляли среду из планшетов и заменяли на 30 мкл бессывороточной "голодной" среды (DMEM с 0,1% БСА с низким содержанием глюкозы) при помощи устройства для работы с жидкостями Biomek FX. Возвращали планшеты в инкубатор на 24 ч.

Получали варианты hFcNRG4, временно экспрессируемые в виде надосадочных жидкостей 293F, в голодной среде в 384-луночном прозрачном планшете (Greiner, кат.№ 781185), проводя последовательное разбавление 1:8 для получения 4 точек (средний диапазон доз от 250 пМ до 140000 пМ). Удаляли среду из планшетов с клеточной культурой и переносили 30 мкл/лунка полученных вариантов в планшеты при помощи многоканального ("stamp") устройства для работы с жидкостями Biomek FX. Герметично закрывали планшеты фольгой и стимулировали в течение 15 мин при комнатной температуре на орбитальном шейкере. Затем промывали клетки один раз 50 мкл холодного ФБР. К клеткам добавляли 30 мкл буфера для лизиса и перемешивали в течение 10 мин при КТ на орбитальном шейкере.

Детектировали фосфорилирование ERK 1/2 с использованием либо набора AlphaScreen SureFire phospho-ERK1/2 (T202/Y204) (Perkin Elmer, кат.№ TGRES), либо набора для исследования AlphaLISA®

SureFire® Ultra× p ERK 1/2 совместно с набором AlphaScreen Protein A IgG Detection Kit (Protein-A) (PerkinElmer, кат.№ 6760617). После лизиса клеток CHO-K1 переносили 4 мкл лизата в 384-луночный планшет Alpha Proxiplate (Perkin Elmer, кат.№ 6008280) с использованием 384-канального дозатора Biomek FX. По 4 мкл лизатов положительного и отрицательного контроля (Perkin Elmer, TGRES-L) добавляли в доступные лунки. В планшет добавляли 5 мкл/лунка акцепторной смеси (содержащей антитела к фосфо-Thr202/Tyr204 и акцепторные гранулы, конъюгированные с протеином А) при помощи Formulatrix Mantis. Закрывали планшет, центрифугировали в течение 1 мин при 300xg и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре на орбитальном шейкере. Добавляли 2 мкл/лунка донорной смеси (содержащей донорные гранулы с покрытием стрептавидина и биотинилированные антитела к дальнему эпитопу ERK1/2) при помощи Mantis. Закрывали планшет, центрифугировали в течение 1 мин при 300xg и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре на орбитальном шейкере, после чего анализировали на многоканальном ридере Perkin Elmer Envision 2103 Multilabel Reader (режим HTS Alpha, продолжительность возбуждения: 40 мс, общая продолжительность измерения: 130 мс).

Для каждого образца строили график зависимости по сравнению с ответом на дозу исходного hFcNRG4, который был включен в каждый планшет в двух повторностях, при помощи XLFit. Строили график по полученным данным в GraphPad Prism при помощи четырехпараметровой подстановки и вычисляли по ним значения активности EC50. Результаты представлены в табл. 5 и 6.

Таблица 5
Активность примеров 1-5 по сравнению с NRG4 дикого типа

Образец	EC50 (нМ)
NRG4 дикого типа	2,53
Пример 1	0,77 ± 0,16
Пример 2	2,77 ± 0,39
Пример 3	0,29 ± 0,01
Пример 4	0,53 ± 0,05
Пример 5	0,84 ± 0,27

Данные для примеров 1-5 представляют собой средние значения для двух экспериментов, также указано среднеквадратическое отклонение.

Как видно из данных, приведенных в табл. 5, и согласуется с повышенной аффинностью в отношении HER4, в данном исследовании модификация DIG также значительно повышала активность в отношении HER4 и HER2 по сравнению с NRG4 дикого типа, включая примеры, которые содержали дополнительные модификации аминокислот.

Таблица 6
Активность примеров 6-8 и 10 по сравнению с NRG1 и NRG4 дикого типа

Образец	EC50 (нМ)
NRG1 дикого типа	0,3192
NRG4 дикого типа	1,2980
Пример 6	0,3947
Пример 7	0,5629
Пример 8	0,4033
Пример 10	0,2448

Как видно из данных, приведенных в табл. 6, в данном исследовании для примеров 6-8 и 10, каждый из которых включал модификацию DIG и дополнительные модификации, показана увеличенная активность в отношении HER4 и HER2 по сравнению с NRG4 дикого типа и схожая активность по сравнению с NRG1 дикого типа.

Исследования HER2-4 или HER2-3 человека и крысы с использованием фосфо-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) для тестирования очищенных белков.

Проводили исследование активности фосфо-ERK1/2 с использованием клеток CHO-K1 с повышенной экспрессией рецепторов HER человека или крысы для определения активности и селективности очищенных соединений NRG4. Культивировали клеточные линии CHO-K1, экспрессирующие рецепторы HER человека или крысы, в среде для отбора (DMEM-F12 3:1с 5% ЭБС и 20 мМ HEPES, 40 мкг/мл L-пролина, 1х антибиотиков, 12 мкг/мл пуромицина, 1 мг/мл гигромицина В). В день -1 (за день до исследования фосфо-ERK1/2), промывали клетки один раз ФБР, отделяли не содержащим ферменты раствором для диссоциации клеток (GIBCO, кат.№ 13151-014) и повторно суспендировали в среде для посева (DMEM-F12 3:1 с 20 мМ HEPES, 1х антибиотиков, 0,2% ЭБС). Помещали клетки в 96-луночный планшет с покрытием поли-D-лизина (BD, кат.№ 354640) с плотностью 10000 клеток в 0,1 мл на лунку. Культивировали клетки в инкубаторе для тканевых культур при 37°C, 5% CO₂, в течение ночи. В день 1 (день исследования pERK1/2) инкубировали планшеты при комнатной температуре в течение 30 мин. Удаляли

питательную среду, затем добавляли 50 мкл лиганда в разных концентрациях, разбавленного в ФБР-20 мМ HEPES-0,005% БСА. Приобретали нативные пептиды NRG1 и NRG4 человека в ReproKine (Tampa, FL). Продолжительность стимуляции составляла 30 мин (за исключением линии hHER2-4 IN6, для которой стимуляцию проводили в течение 15 мин). По завершении стимуляции удаляли лиганды и добавляли 70 мкл буфера для лизиса (получен согласно рецептуре производителя, Perkin Elmer, кат.№ ALSU-PERK-A10K). Инкубировали планшеты при комнатной температуре в течение 10 мин на планшетном шейкере, перемешивая при 350 об./мин, затем во льду в течение 1 ч без встряхивания. Переносили 30 мкл клеточных лизатов в 96-луночный белый планшет Optiplate (Perkin Elmer, кат.№ 6002290) для исследования фосфо-ERK1/2. Вкратце, к 30 мкл лизатов в Optiplate добавляли 7,5 мкл акцепторных гранул. Накрывали планшет алюминиевой фольгой и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч на планшетном шейкере, перемешивая при 350 об./мин. Затем добавляли 7,5 мкл донорных гранул и накрывали планшет алюминиевой фольгой и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч на планшетном шейкере, перемешивая при 350 об./мин, или при 4°C в течение ночи (грели планшет при комнатной температуре в течение 2 ч перед анализом). Считывали сигнал Alpha на оборудовании Envision (планшет-ридер, совместимый с технологией Alpha). Донорные гранулы и акцепторные гранулы получали согласно протоколу исследования. Показанные данные получали с использованием либо набора для исследования AlphaScreen SureFire p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (кат.№ TGRES50k), либо набора для исследования AlphaLISA® SureFire® Ultra™ p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) (Perkin Elmer, кат.№ ALSU-PERK-A10K). Активность пептида NRG1 была схожей в обоих типах исследований. Импортировали исходные данные, полученные на оборудовании Envision, в программное обеспечение GraphPad Prism (версия 7). Получали значение EC50 из кривой четырехпараметрической зависимости доза-ответ с переменным коэффициентом наклона. Получали данные в виде % от максимальной активности NRG1 как отношение среднего максимального исходного значения для соединения NRG4 к среднему максимальному исходному значению для нативного NRG1 человека, умноженное на 100. Данные приведены ниже в табл. 7-9. Значения N отражают число проведенных независимых исследований.

Таблица 7

Исследование HER2/HER4 человека

Образец	EC50 (нМ)	% от максимальной активности NRG1
NRG1 дикого типа	0,67 ± 0,07 (N=9)	100
NRG4 дикого типа	90,09 ± 33,21 (N=8)	75 ± 4 (N=8)
Пример 9	0,20 ± 0,01 (N=11)	91 ± 3 (N=11)
Пример 10	0,16 ± 0,02 (N=8)	82 ± 4 (N=8)
Пример 11	0,55 ± 0,11 (N=5)	79 ± 2 (N=5)

Таблица 8

Исследование HER2/HER4 крысы

Образец	EC50 (нМ)	% от максимальной активности NRG1
NRG1 дикого типа	0,29 ± 0,05 (N=4)	100
Пример 9	0,17 ± 0,02 (N=4)	87 ± 4 (N=4)
Пример 10	0,12 ± 0,04 (N=2)	88 ± 7 (N=2)
Пример 11	0,17 ± 0,06 (N=2)	96 ± 2 (N=2)

Как видно из табл. 7, пептид NRG1 человека дикого типа демонстрирует высокую активность в отношении рецепторов HER4 и HER2 человека, при этом пептид NRG4 человека дикого типа действует как слабый частичный агонист. Примеры 9-11 демонстрируют высокую активность, и значения EC50 соответствуют слегка более высокой эффективности по сравнению с NRG1 человека дикого типа, и максимальная активность в % превышает активность пептида NRG4 человека дикого типа и близка активности NRG1 человека. Как видно из табл. 8, схожие результаты получены и для рецепторов HER4 HER2 крысы, наблюдается небольшое увеличение эффективности по сравнению с NRG1 человека и максимальная активность, близкая активности NRG1 человека. В заключение, для показанных примеров соединений NRG4 продемонстрирована активность фосфо-ERK1/2 в отношении рецепторов HER4 HER2 как человека, так и крысы, более высокая по сравнению с нативным NRG4 человека и близкая активности нативного NRG1 человека.

Таблица 9

Исследование HER2/HER3 человека и крысы

	Исследование HER2/HER3 человека	Исследование HER2/HER3 крысы
Образец	EC50 (нМ)	EC50 (нМ)
NRG1 дикого типа	0,83 ± 0,20 (N=6)	32 ± 14 (N=2)
NRG4 дикого типа	Активность отсутствует вплоть до 1000 нМ (N=1)	НО
Пример 9	Активность отсутствует вплоть до 3000 нМ (N=6)	Активность отсутствует вплоть до 3000 нМ (N=4)
Пример 10	Активность отсутствует вплоть до 1000 нМ (N=3)	Активность отсутствует вплоть до 100 нМ (N=2)
Пример 11	Активность отсутствует вплоть до 1000 нМ (N=1)	Активность отсутствует вплоть до 1000 нМ (N=2)

Как видно из таблицы 9, пептид NRG1 человека дикого типа демонстрирует высокую активность в отношении рецепторов HER3 HER2 человека, при этом для пептида NRG4 человека дикого типа и всех примеров не показана активность в отношении указанной пары рецепторов, что свидетельствует о селективности, отличающейся от селективности в отношении пары рецепторов HER4 HER2. В заключение, для примеров соединений NRG4 не продемонстрирована активность фосфо-ERK1/2 в отношении рецепторов HER3 HER2, что, таким образом, указывает на сохранение селективности в отношении рецепторов HER4 и HER2, присущей пептиду NRG4 дикого типа.

Исследования *in vivo*.

Влияние примера 9 на сердечную функцию и структуру в модели ИМ у крыс.

Были проведены два неклинических фармакологических исследования эффективности на крысиной модели сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса (СН СФВ) для изучения концентрации в плазме и продолжительности воздействия примера 9. В обоих исследованиях измеряли влияние на сердечную функцию и структуру у самцов крыс линии Спрег-Доули с хирургически индуцированным инфарктом миокарда.

В обоих исследованиях использовали схожие методики. Приобретали самцов крыс линии Спрег-Доули с хирургически индуцированным инфарктом миокарда, анестезировали и проводили вентиляцию с положительным давлением во время процедуры. Делали разрез между четвертым и пятым ребрами, открывая доступ к сердцу. Проводили перманентное лигирование левой коронарной артерии. Животным с имитацией операции проводили такую же процедуру с тем исключением, что вокруг левой коронарной артерии накладывали шелковый шов, который не затягивали. Размещали всех крыс в отдельные клетки в помещении с контролируемой температурой и влажностью и выдерживали с циклом 12 ч свет/тьма. Через две-три недели после операции проводили трансторакальную эхокардиографию крыс для определения фракции выброса (ФВ%) и размеров левого желудочка (РЛЖ) с использованием ультразвуковой системы Vevo 2100. Случайным образом распределяли крыс по группам лечения в соответствии с показателями ФВ% и РЛЖ.

Измеренные значения ФВ% и РЛЖ выражали как среднее ± стандартная ошибка (SE). Проводили статистический анализ при помощи программного обеспечения JMP® 13 (SAS Institute, Inc.; Cary, NC) и использовали критерий Даннета для статистического сравнения групп лечения. За приемлемый уровень статистической значимости принимали $P < 0,05$.

Дизайн неклинического исследования эффективности для определения концентрации примера 9 в плазме. При скорости инфузии 10 мкл/ч непрерывно подкожно (ПК) вводили пример 9 или носитель (1X фосфатный буферный раствор Дульбекко [DPBS]) в течение 4 дней при помощи помп Alzet® (модель 2ML1; осмотические помпы Alzet®; Cupertino, CA). Вводимые при помощи инфузионной помпы дозировки примера 9 составляли 0,22, 0,73, 2,18 и 7,28 мг/кг/день. На 4 день собирали пробы крови для определения концентрации в плазме и удаляли инфузионную помпу. Через семь дней после начала введения оценивали сердечную функцию (ФВ%) и структуру (РЛЖ) у всех животных. Через четырнадцать дней после начала введения оценивали ФВ% и РЛЖ в группе, в которой вводили носитель, и в двух группах с самыми высокими дозами лекарственного средства.

Результаты. Для введения примера 9 продемонстрировано зависящее от дозы улучшение сердечной функции (ФВ%) при введении в течение 96 ч с использованием осмотической помпы (табл. 10). Для групп, в которых вводили самые высокие дозы 2,18 и 7,28 мг/кг/день, показано улучшение сердечной функции в течение 2 недель после начала инфузии (табл. 10). Указанные дозы обеспечивают стационарные концентрации в плазме 29,62 и 72,24 нМ, соответственно (табл. 11). Для всех животных с ИМ после лечения показано меньшее увеличение РЛЖ по сравнению с группой, в которой вводили носитель (табл. 10).

Таблица 10

Влияние 96-часовой инфузии на ФВ в модели СН СФВ у крыс

Доза (мг/кг/день)	Фракция выброса					
	Исходный уровень		Через 7 дней после начала введения		Через 14 дней после начала введения	
	СРЕДНЕ Е	SE	СРЕДНЕ Е	SE	СРЕДНЕЕ	SE
Имитация, N=3	70,2	6,42	68,1	4,64	НО	НО
Носитель, N=7	41,7	1,97	39,6	1,92	39,6	1,73
0,22, N=5	41,6	2,57	43,9	2,04	НО	НО
0,73, N=7	42,3	1,42	45,8	2,09	НО	НО
2,18, N=7	41,4	1,90	48,9*	1,72	45,5	1,61
7,28, N=7	41,1	1,06	49,8*	2,10	48,0*	2,08
Диаметр левого желудочка (конечно-диастолический)						
Доза (мг/кг/день)	Исходный уровень		Через 7 дней после начала введения		Через 14 дней после начала введения	
	СРЕДНЕ Е	SE	СРЕДНЕ Е	SE	СРЕДНЕЕ	SE
	Имитация, N=3	7,21	0,51	7,49	0,76	НО
Носитель, N=7	7,56	0,35	7,94	0,26	7,90	0,25
0,22, N=5	7,51	0,42	7,53	0,57	НО	НО
0,73, N=7	7,55	0,27	7,83	0,30	НО	НО
2,18, N=7	7,50	0,34	7,68	0,24	7,75	0,19
7,28, N=7	7,60	0,29	7,52	0,31	7,67	0,19

Сокращения: n=число животных; НО = не определяли; SE = стандартная ошибка. * $p < 0,05$ по сравнению с носителем.

Таблица 11

Уровень в плазме крыс после 96-часовой инфузии

Доза (мг/кг/день)	Среднее (нМ)	Среднеквадратическое отклонение
0,22	2,59	0,71
0,73	9,94	1,59
2,18	29,62	4,86
7,28	72,24	13,66

Дизайн неклинического исследования эффективности для определения продолжительности инфузии. При скорости инфузии 10 мкл/ч вводили ПК 2,18 мг/кг/день примера 9 или носителя (DPBS) в течение 48, 72 или 96 ч с использованием помп Alzet®. После завершения указанной фазы инфузии собирали пробы крови для определения концентрации в плазме и удаляли инфузионную помпу. Через семь дней после начала введения оценивали сердечную функцию (ФВ%) и структуру (РЛЖ) у всех животных.

Результаты. Как видно из табл. 12, в данном исследовании для введения примера 9 продемонстрировано зависящее от продолжительности инфузии улучшение сердечной функции при введении в течение периода от 48 до 96 ч с использованием помпы Alzet. Инфузия примера 9 в течение 72 ч и 96 ч приводила к значительному увеличению ФВ на 7 день после начала введения. Для всех животных с ИМ после лечения показано меньшее увеличение РЛЖ по сравнению с группой, в которой вводили носитель.

Таблица 12

Влияние разной продолжительности инфузии примера 9 на сердечную функцию

Продолжительность (часы)	Фракция выброса			
	Исходный уровень		Через 7 дней после начала введения	
	СРЕДНЕЕ	SE	СРЕДНЕЕ	SE
Носитель, N=8	40,8	2,80	39,2	2,78
48, N=8	40,6	1,26	42,6	1,35
72, N=9	41,0	1,96	44,6*	1,69
96, N=9	41,8	1,77	46,2*	2,19
	Диаметр левого желудочка (конечно-диастолический)			
	Исходный уровень		Через 7 дней после начала введения	
	СРЕДНЕЕ	SE	СРЕДНЕЕ	SE
Носитель, N=8	7,49	0,20	8,10	0,24
48, N=8	7,52	0,29	7,68	0,30
72, N=9	7,55	0,21	7,87	0,20
96, N=9	7,44	0,16	7,70	0,22

Сокращения: n=число животных; НО = не определяли; SE = стандартная ошибка, *p<0,05 по сравнению с носителем.

Таблица 13

Уровень в плазме в модели инфаркта миокарда у крыс после инфузии примера 9

Продолжительность инфузии (часы)	Среднее (нМ)	Среднеквадратическое отклонение
48	40,13	6,37
72	47,28	17,85
96	31,42	9,86

Данные неклинических исследований показали улучшение ФВЛЖ в модели СН СФВ у крыс при поддержании концентрации примера 9 в плазме от 3 до 100 нМ в течение периода от 72 до 96 ч.

Влияние примера 10 на сердечную функцию и структуру в модели ИМ у крыс.

Проводили неклиническое фармакологическое исследование эффективности на крысиной модели сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса (СН СФВ) для оценки изменений сердечной функции и структуры после введения каптоприла, введения примера 10 или комбинированного лечения.

Способы. Приобретали самцов крыс линии Спрег-Доули с хирургически индуцированным инфарктом миокарда, анестезировали и проводили вентиляцию с положительным давлением во время процедуры. Делали разрез между четвертым и пятым ребрами, открывая доступ к сердцу. Проводили перманентное лигирование левой коронарной артерии. Размещали всех крыс в отдельные клетки в помещении с контролируемой температурой и влажностью и выдерживали с циклом 12 ч свет/тьма. Через две-три недели после операции проводили трансторакальную эхокардиографию крыс для определения фракции выброса (ФВ%) и размеров левого желудочка (РЛЖ) с использованием ультразвуковой системы Vevo 2100. Случайным образом распределяли крыс по группам лечения в соответствии с показателями ФВ% и РЛЖ.

Измеренные значения ФВ% и РЛЖ выражали как среднее \pm стандартная ошибка (SE). Проводили статистический анализ при помощи программного обеспечения JMP® 13 (SAS Institute, Inc.; Cary, NC) и использовали критерий Даннета для статистического сравнения групп лечения. За приемлемый уровень статистической значимости принимали P<0,05.

Дизайн исследования. Через три недели после хирургической индукции ИМ случайным образом распределяли животных в 2 группы лечения (плацебо или каптоприл, 2 г/л в питьевой воде, ad libitum) в соответствии с показателями ФВ% и РЛЖ. Через три недели и четыре недели после начала введения оценивали сердечную функцию (ФВ%) и структуру (РЛЖ) путем трансторакальной эхокардиографии. Проводили дальнейшую рандомизацию животных по дополнительным группам на основании показателей сердечной функции (ФВ%) и структуры (РЛЖ): плацебо, пример 10, каптоприл и пример 10+каптоприл. Животные в группах, в которых вводили пример 10, получали одну инъекцию на 4 неделе после 2^й рандомизации. Оценивали сердечную функцию (ФВ%) и структуру (РЛЖ) на 5 и 6 неделе.

Результаты. Результаты представлены в табл. 14.

Таблица 14

Влияние каптоприла, одной инъекции примера 10 или комбинированной терапии на ФВ в крысиной модели сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса

	Фракция выброса										
	Исходный уровень		3 неделя			4 неделя		5 неделя		6 неделя	
	CP	SE	CP	SE		CP	SE	CP	SE	CP	SE
Носитель	38,2	1,42	32,8	1,55	Носитель	33,4	2,49	30,0	2,70	29,9	2,43
Каптоприл	39,1	1,30	38,4	2,43	Каптоприл	36,1	2,66	36,2	3,23	34,6	3,09
					Пример 10	33,3	2,06	46,5*	3,68	46,0*	2,46
					Пример 10 + каптоприл	35,8	1,96	47,3*	1,97	46,7*	2,45
Диаметр левого желудочка (конечно-диастолический)											
	Исходный уровень		3 неделя			4 неделя		5 неделя		6 неделя	
	CP	SE	CP	SE		CP	SE	CP	SE	CP	SE
	Носитель	8,75	0,25	9,00	0,18	Носитель	9,25	0,44	10,16	0,46	9,92
Каптоприл	8,66	0,16	8,57	0,14	Каптоприл	8,64	0,29	8,64*	0,24	8,71*	0,21
					Пример 10	9,33	0,24	9,35	0,37	9,01	0,25
					Пример 10 + каптоприл	8,82	0,12	8,51*	0,23	8,41*	0,28

Сокращения: CP = среднее, SE = стандартная ошибка. * $p < 0,05$ по сравнению с носителем.

Как видно из табл. 14, несмотря на то, что введение каптоприла замедляло ухудшение сердечной функции после 6-недельного лечения (статистически незначимо), введение примера 10 значительно улучшало сердечную функцию (ФВ%) и снижало расширение ЛЖ после однократного введения.

Влияние примера 11 на сердечную функцию и структуру в модели ИМ у крыс.

Проводили неклиническое фармакологическое исследование эффективности в крысиной модели сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса (СН СФВ) для выявления взаимосвязи доз-ответ для примера 11.

Способ. Приобретали самцов крыс линии Спрег-Доули с хирургически индуцированным инфарктом миокарда в Charles River. Вкратце, крыс анестезировали и проводили вентиляцию с положительным давлением во время процедуры. Делали разрез между четвертым и пятым ребрами, открывая доступ к сердцу. Проводили перманентное лигирование левой коронарной артерии. Животным с имитацией операции проводили такую же процедуру с тем исключением, что вокруг левой коронарной артерии накладывали шелковый шов, который не затягивали. Размещали всех крыс в отдельные клетки в помещении с контролируемой температурой и влажностью и выдерживали с циклом 12 ч свет/тьма. Через три недели после операции проводили трансторакальную эхокардиографию крыс для определения фракции выброса (ФВ%) и размеров левого желудочка (РЛЖ) с использованием ультразвуковой системы Vevo 2100. Случайным образом распределяли крыс по группам лечения в соответствии с показателями ФВ% и РЛЖ.

Измеренные значения ФВ% и РЛЖ выражали как среднее \pm стандартная ошибка (SE). Проводили статистический анализ при помощи программного обеспечения JMP® 13 (SAS Institute, Inc.; Cary, NC) и использовали критерий Даннета для статистического сравнения групп лечения. За приемлемый уровень статистической значимости принимали $P < 0,05$.

Дизайн исследования. Через две-три недели после хирургической индукции ИМ животных распределяли по группам лечения и вводили одну инъекцию носителя (DPBS) или одной из 3 дозировок (0,3, 1, 3 мг/кг) примера 11. Через семь дней, 14 дней и 21 день после начала введения оценивали сердечную функцию (ФВ%) и структуру (РЛЖ) у всех животных.

Результаты. Результаты представлены в табл. 15.

Таблица 15

Влияние примера 11 на ФВ в крысиной модели сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса

Доза	Фракция выброса							
	Исходный уровень		Через 7 дней после введения		Через 14 дней после введения		Через 21 день после введения	
	СРЕДНЕЕ	SE	СРЕДНЕЕ	SE	СРЕДНЕЕ	SE	СРЕДНЕЕ	SE
Имитация, N=5	73,7	2,2 4	72,5	1,76	71,8	0,81	71,9	3,6 0
Носитель, N=8	45,0	1,5 0	41,2	2,90	38,4	1,98	37,8	1,9 8
0,3 мг/кг, N=8	45,4	2,4 6	50,1*	3,22	42,6	1,43	36,4	1,4 3
1 мг/кг, N=8	46,6	1,8 6	52,4*	2,61	42,2	2,77	39,7	2,7 7
3 мг/кг, N=8	45,8	1,4 8	54,7*	2,11	54,0*	2,49	39,6	2,4 9

Сокращения: n=число животных; SE = стандартная ошибка. * $p < 0,05$ по сравнению с носителем.

Как видно из табл. 15, для введения примера 11 продемонстрировано зависящее от дозы улучшение сердечной функции (ФВ%). В группе, в которой вводили высокую дозу, показано улучшение сердечной функции в течение 2 недель после лечения. На протяжении исследования различия в увеличении РЛЖ в разных группах не наблюдались (данные не показаны).

Влияние примеров 9-11 на кардиотоксичность.

Проводили токсикологические исследования примеров 9-11 на крысах и/или яванских макаках. Вводили пример 10 крысам в виде одной ПК 0,3 мг/кг инъекции, в результате чего концентрации в плазме поддавались обнаружению в течение периода дольше 168 ч. Умерщвляли крыс, и по результатам изучения тканей были выявлены дегенерация сердца и некроз. Вводили пример 11 крысам в виде одной ПК 30 мг/кг инъекции; концентрация в плазме не поддавалась обнаружению через 96 ч. Умерщвляли крыс, и по результатам изучения тканей не были выявлены признаки дегенерации сердца и/или некроза. Вводили пример 11 в виде одной 3 мг/кг дозы самцам и самкам обезьян путем ПК инъекции болюса. В отличие от фармакокинетики у крыс однократные инъекции обезьянам приводили к тому, что для выведения подающихся обнаружению концентраций из плазмы требовалось более 168 ч. Умерщвляли обезьян, и по результатам изучения тканей были выявлены дегенерация сердца и некроз. Вводили пример 9, период полувыведения которого после ПК введения крысам составлял менее часа, в дозах, обеспечивавших концентрацию в плазме в диапазоне 3-300 нМ в течение 96-168 ч с использованием подкожно (ПК) имплантированных помп. Умерщвляли крыс, и по результатам изучения тканей не были выявлены признаки дегенерации сердца и/или некроза. Вводили пример 9, период полувыведения которого после ПК введения обезьянам составлял менее 5 ч, в дозах, обеспечивавших концентрацию в плазме в диапазоне 30-1000 нМ в течение 96 ч, самцам и самкам обезьян путем хирургического введения ПК или внутривенного (ВВ) катетера. Умерщвляли обезьян, и по результатам изучения тканей не были выявлены признаки кардиотоксичности и/или некроза. Полученные данные показывают, что соединения NRG4 могут быть введены в отсутствие кардиотоксичности при ограничении продолжительности воздействия соединения NRG4.

Последовательности.

SEQ ID NO:1 - NRG4 человека

DHEEPCGPSH KSFCLNGGLC YVIPTIPSPF CRCVENYTGA RCEEVFL

SEQ ID NO:2 - соединение NRG4

X₀GHEEPCGX₈SHKSFCLNGGLCYX₂₂IPX₂₆PSPFCRCVX₃₅NYTGARCEX₄₄VFL

где: X₀ выбран из группы, состоящей из T, PT, MPT, S, GS, GGS, GGGs и (GGGGX_λ)_n, причем

X_λ представляет собой Q, A, E или S, и n=1-5 (SEQ ID NO:5), или отсутствует;

X₈ представляет собой E или P;

X₂₂ представляет собой Q или V;

X₂₆ представляет собой F или I;

X₃₅ представляет собой E или A; и

X₄₄ представляет собой H, K или E.

SEQ ID NO:3 - полная последовательность экспрессируемого NRG4 человека

MPTDHEEPCG PSHKSFCLNG GLCYVIPTIP SPFCRCVENY TGARCEEVFL
PGSSIQTKSN LFEAFVALAV LVTLIIGAFY FLCRKGFHFQR ASSVQYDINL
VETSSTSAHH SHEQH

SEQ ID NO:4 - соединение NRG4

GHEEPCGPSH KSFCLNGGLC YQIPTIPSPF CRCVENYTGA RCEKVFL

SEQ ID NO:5 - богатый глицином пептид или линкер
(GGGGX_n)_n

где: X_n представляет собой Q, A, E или S; и
n равен 1-5.

SEQ ID NO:6 - Fc область IgG

ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG

SEQ ID NO:7 - Fc область IgG

ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG

SEQ ID NO:8 - Fc область IgG

ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNAYTQKLSLSLSPG

SEQ ID NO:9 - Fc область IgG

ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNAYTQKLSLSLSPG

SEQ ID NO:10 - соединение NRG4

GGGGSGGGGSGGGGS GHEEPCGSPH KSFCLNGGLC YVIPTIPSPF CRCVENYTGA
RCEEVFL

SEQ ID NO: 11 - соединение NRG4

GGGGSGGGGSGGGGS GHEEPCGESH KSFCLNGGLC YVIPTIPSPF CRCVENYTGA
RCEEVFL

SEQ ID NO:12 - соединение NRG4

GGGGSGGGGSGGGGS GHEEPCGSPH KSFCLNGGLC YQIPTIPSPF CRCVENYTGA
RCEEVFL

SEQ ID NO: 13 - соединение NRG4

GGGGSGGGGSGGGGS GHEEPCGSPH KSFCLNGGLC YVIPTFSPF CRCVENYTGA
RCEEVFL

SEQ ID NO:14 - соединение NRG4

GGGGSGGGGSGGGGS GHEEPCGSPH KSFCLNGGLCYVIPTIPSPFCRCVANYTGA
RCEEVFL

SEQ ID NO:15 - соединение NRG4

GGGGSGGGGSGGGGS GHEEPCGSPH KSFCLNGGLCYVIPTFSPFCRCVENYTGARCEK
VFL

SEQ ID NO:16 - соединение NRG4

GGGGSGGGGSGGGGS GHEEPCGSPH KSFCLNGGLCYVIPTFSPFCRCVENYTGARCEH
VFL

SEQ ID NO:17 - соединение NRG4

GGGGSGGGGSGGGGS GHEEPCGESH KSFCLNGGLCYVIPTFSPFCRCVENYTGARCEE
VFL

SEQ ID NO:18 - соединение NRG4

GGGGSGHEEPCGSPH KSFCLNGGLCYQIPTIPSPFCRCVENYTGARCEK VFL

SEQ ID NO:19 - соединение NRG4

GGGGSGGGGSGGGGS GHEEPCGSPH KSFCLNGGLCYQIPTIPSPFCRCVENYTGARCEK
VFL

SEQ ID NO:20

GGGS

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение NRG4, содержащее модификацию остатка D в положении 1 с заменой его на остаток G и до пяти дополнительных модификаций по сравнению с аминокислотной последовательностью NRG4 человека (SEQ ID NO:1).

2. Соединение, содержащее формулу:

X₀GHEEPCGX₈SHKSFCLNGGLCYX₂₂IPTX₂₆PSPFCRCVX₃₅NYTGARCEX₄₄VFL, где:

- X_0 выбран из группы, состоящей из GGGS и $(GGGX_\lambda)_n$, причем X_λ представляет собой S, и $n=1-3$ (SEQ ID NO:5), или отсутствует;
- X_8 представляет собой E или P;
- X_{22} представляет собой Q или V;
- X_{26} представляет собой F или I;
- X_{35} представляет собой E или A; и
- X_{44} представляет собой H, K или E (SEQ ID NO:2).
3. Соединение по п.2, отличающееся тем, что X_8 представляет собой P; X_{22} представляет собой V; X_{26} представляет собой I; X_{35} представляет собой E; и X_{44} представляет собой E.
4. Соединение по п.2, отличающееся тем, что X_8 представляет собой E; X_{22} представляет собой V; X_{26} представляет собой I; X_{35} представляет собой E; и X_{44} представляет собой E.
5. Соединение по п.2, отличающееся тем, что X_8 представляет собой P; X_{22} представляет собой Q; X_{26} представляет собой I; X_{35} представляет собой E; и X_{44} представляет собой E.
6. Соединение по п.2, отличающееся тем, что X_8 представляет собой P; X_{22} представляет собой V; X_{26} представляет собой F; X_{35} представляет собой E; и X_{44} представляет собой E.
7. Соединение по п.2, отличающееся тем, что X_8 представляет собой P; X_{22} представляет собой V; X_{26} представляет собой I; X_{35} представляет собой A; и X_{44} представляет собой H или E.
8. Соединение по п.2, отличающееся тем, что X_8 представляет собой P; X_{22} представляет собой V; X_{26} представляет собой F; X_{35} представляет собой E; и X_{44} представляет собой K.
9. Соединение по п.2, отличающееся тем, что X_8 представляет собой P; X_{22} представляет собой V; X_{26} представляет собой F; X_{35} представляет собой E; и X_{44} представляет собой H.
10. Соединение по п.2, отличающееся тем, что X_8 представляет собой E; X_{22} представляет собой V; X_{26} представляет собой F; X_{35} представляет собой E; и X_{44} представляет собой E.
11. Соединение по п.2, отличающееся тем, что X_8 представляет собой P; X_{22} представляет собой Q; X_{26} представляет собой I; X_{35} представляет собой E; и X_{44} представляет собой K.
12. Соединение по любому из пп.2-11, дополнительно содержащее Fc область IgG.
13. Соединение по п.12, отличающееся тем, что X_0 представляет собой SEQ ID NO:5, где X_λ представляет собой S, и $n=3$, и Fc область IgG содержит димер SEQ ID NO:6 и SEQ ID NO:7, причем N-концевая аминокислота в X_0 слита с C-концевой аминокислотой в SEQ ID NO:7.
14. Соединение по п.12, отличающееся тем, что X_0 представляет собой SEQ ID NO:5, где X_λ представляет собой S, и $n=3$, и Fc область IgG содержит димер SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:9, причем N-концевая аминокислота в X_0 слита с C-концевой аминокислотой в SEQ ID NO:9.
15. Соединение по любому из пп.2-11, отличающееся тем, что X_0 представляет собой SEQ ID NO:5, где X_λ представляет собой S, и $n=1$.
16. Соединение по любому из пп.2-11, отличающееся тем, что указанное соединение содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18 и SEQ ID NO:19.
17. Соединение, состоящее из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:18.
18. Соединение по любому из пп.1-17, отличающееся тем, что указанное соединение обладает активностью, обусловленной связыванием HER4, которая превышает активность нативного NRG4 человека и составляет по меньшей мере 70% от максимальной активности нативного NRG1 человека.
19. Соединение по любому из пп.1-18, отличающееся тем, что указанное соединение не имеет активности, обусловленной связыванием HER3.
20. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп.1-19 и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.
21. Устройство в виде помпы, содержащее соединение по любому из пп.1-19.
22. Способ лечения или предотвращения сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса (СН СФВ) у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение указанному пациенту соединения NRG4 по любому из пп.1-19 в количестве, достаточном для обеспечения терапевтически эффективной концентрации указанного соединения NRG4 в сыворотке в течение 24-96 ч.
23. Способ по п.22, отличающийся тем, что указанное отношение эффективность:введение составляет от примерно 2 до примерно 50.
24. Способ по любому из пп.22, 23, отличающийся тем, что указанное соединение NRG4 вводят раз в квартал (Q3M) путем непрерывной подкожной инфузии в течение 24-96 ч.
25. Способ по любому из пп.22-24, отличающийся тем, что указанное соединение NRG4 вводят при помощи пластырной помпы.
26. Способ по любому из пп.22-25, отличающийся тем, что лечение продолжают в течение по меньшей мере 1 года.
27. Способ по любому из пп.22-26, отличающийся тем, что указанный способ приводит к значи-

тельному увеличению фракции выброса левого желудочка (ФВЛЖ).

28. Способ по любому из пп.22-27, отличающийся тем, что указанный способ приводит к значительному снижению глобальной продольной деформации (ГПД).

29. Способ по любому из пп.22-28, отличающийся тем, что указанный способ приводит к значительному увеличению конечно-диастолического объема левого желудочка (КДОЛЖ).

30. Способ по любому из пп.22-29, отличающийся тем, что указанный способ приводит к значительному снижению риска смерти от сердечно-сосудистого заболевания.

31. Способ по любому из пп.22-30, отличающийся тем, что указанный способ приводит к значительному снижению риска госпитализации, связанной с сердечной недостаточностью (СН).

32. Способ по любому из пп.22-31, отличающийся тем, что указанный пациент страдает от сердечной недостаточности класса II или III по классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (НУНА).

33. Способ по любому из пп.22-32, отличающийся тем, что указанное соединение NRG4 представляет собой соединение NRG4 по любому из пп.1-19.

34. Применение соединения NRG4 по любому из пп.1-19 для лечения или предотвращения СН СФВ.

35. Применение по п.34, отличающееся тем, что указанное соединение NRG4 вводят Q3M путем непрерывной подкожной инфузии в течение 24-96 ч.

36. Применение по любому из пп.34, 35, отличающееся тем, что указанное отношение эффективности:введение составляет от примерно 2 до примерно 50.

37. Применение по любому из пп.34-36, отличающееся тем, что указанное соединение NRG4 вводят при помощи пластырной помпы.

38. Применение по любому из пп.34-37, отличающееся тем, что указанный пациент страдает от сердечной недостаточности класса II или III по НУНА.

39. Применения соединения NRG4 по любому из пп.1-19 для лечения или предотвращения СН СФВ, отличающееся тем, что указанное соединение NRG4 вводят в течение 48-96 ч.

