

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 047888

(13) B1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2024.09.25

(21) Номер заявки  
202393497

(22) Дата подачи заявки  
2022.06.02

(51) Int. Cl. A61K 31/4468 (2006.01)  
A61P 9/04 (2006.01)  
A61P 9/10 (2006.01)

---

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ПИПЕРИДИН МОЧЕВИНЫ В КАЧЕСТВЕ  
ИНОТРОПНЫХ АГЕНТОВ

---

(31) 21177292.6

(32) 2021.06.02

(33) EP

(43) 2024.02.21

(86) PCT/EP2022/065013

(87) WO 2022/253941 2022.12.08

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
ХЕЛСИНН ХЕЛСКЕА СА (СН);  
АНАКАРДИО АБ (SE)

(72) Изобретатель:  
Лунд Ларс (SE), Бернареджи  
Альберто (IT), Ловати Эмануэла (СН),  
Джулиано Клаудио, Пьетра Клаудио  
(IT)

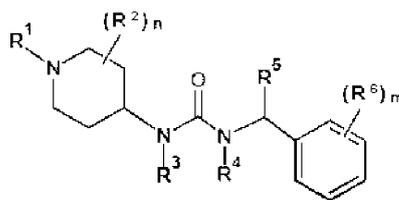
(74) Представитель:

Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,  
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов  
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,  
Кузнецова Т.В. (RU)

(56) WO-A2-2012116176  
WO-A1-2015134839

QIANG SUN, ET AL. "Effects of  
GH secretagogues on contractility and. Ca<sup>2+</sup>  
homeostasis of isolated adult rat ventricular  
myocytes", ENDOCRINOLOGY, vol. 151, no. 9,  
1 September 2010 (2010-09-01), pages 4446-4454,  
XP055856627, Oxford University Press, Oxford, GB  
ISSN: 0013-7227, DOI: 10.1210/en.2009-1432 page  
4451

(57) Изобретение относится к применению соединений, представленных формулой (I)



(I)

в качестве инотропных агентов. Соединения формулы (I), которые включают предпочтительно 1-[(1S)-1-(2,3-дихлор-4-метоксифенил)этил]-3-метил-3-[(4R)-1-метил-3,3-диметил-4-пиперидил] мочевины и ее гидрохлоридную соль, описанные в настоящей патентной заявке, обладают значительной инотропной активностью в отношении кардиомиоцитов, как нормальных, так и вызванных инфарктом миокарда моделей сердечной недостаточности на животных, что делает их полезными для лечения нуждающихся в этом пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. В отличие от известных инотропных агентов, соединения по настоящей патентной заявке эффективны в отношении сократительной способности кардиомиоцитов, не влияя на мобилизацию кальция. Соответственно, они преимущественно свободны от побочных эффектов, вызванных повышенными концентрациями кальция, таких как повышенная потребность в кислороде, тахикардия, аритмия, ишемия и аналогичное им. Таким образом, стал доступен новый, безопасный и эффективный инотропный метод лечения.

B1

047888

047888

B1

### Уровень техники

Сердечная недостаточность (СН) (HF), также известная как застойная сердечная недостаточность, является распространенным серьезным патологическим состоянием, характеризующимся недостаточной насосной способностью сердца, которое не может поддерживать скорость кровотока, необходимую для метаболизма в организме, или может поддерживать это только вторично по отношению к нейрогормональным факторам активации, что приводит, среди прочего, к задержке жидкости и появлению признаков и симптомов сердечной недостаточности. СН является основной причиной госпитализации среди пожилых людей. В 2015 году от нее пострадало около 40 миллионов человек во всем мире. В целом около 2% взрослого населения страдает сердечной недостаточностью, а у людей старше 65 лет эта цифра возрастает до 6-10%. СН может иметь фатальные последствия, при этом риск смерти составляет около 35% в первый год после постановки диагноза.

Признаки и симптомы сердечной недостаточности обычно включают одышку, чрезмерную усталость и отеки ног. Одышка обычно усиливается при физической нагрузке или в положении лежа и может являться причиной ночных пробуждений человека. Распространенные причины сердечной недостаточности включают ишемическую болезнь сердца, в том числе перенесенный ранее инфаркт миокарда (сердечный приступ), высокое кровяное давление, фибрилляцию предсердий, пороки клапанов сердца, чрезмерное употребление алкоголя, инфекции и кардиомиопатию неизвестной этиологии. Эти факторы вызывают сердечную недостаточность, изменяя структуру и/или функцию сердца. СН может быть связана со сниженной фракцией выброса (СНнФВ) (HFrEF) или с сохраненной фракцией выброса (СНсФВ) (HFpEF), в зависимости от того, потеряна или сохранена физиологическая способность левого желудочка сокращаться или расслабляться.

Лечение СН зависит от тяжести и причины заболевания. У людей с хронической стабильной сердечной недостаточностью, независимо от фракции выброса, лечение обычно состоит из изменений образа жизни, таких как отказ от курения, физические упражнения и изменения диеты; лечения основных факторов риска, таких как гипертония, и облегчения симптомов с помощью диуретиков. Класс препаратов, используемых для лечения СН, по своей сути очень разнообразен и включает молекулы с различными эффектами и механизмами действия, такие как: сосудорасширяющие средства, направленные на расширение кровеносных сосудов, облегчение кровотока и снижение артериального давления; диуретики и антагонисты альдостерона, призванные помочь при задержке жидкости; ингибиторы АПФ (АСЕ), препараты БРА (ARB) или АРНи (ARNi), направленные на улучшение функции сердца и увеличение продолжительности жизни; гликозиды наперстянки, направленные на усиление сердечных сокращений; антикоагулянты или антиагреганты для предотвращения образования тромбов; бета-блокаторы для улучшения работы сердца; ингибиторы (НЗПГ2) SGLT2, обладающие комплексным полезным действием, транквилизаторы для снижения тревожности. Например, у пациентов с сердечной недостаточностью, вызванной снижением фракции выброса, рекомендуются ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, блокаторы рецепторов ангиотензина или сакубитрил/валсартан (АРНИ) вместе с бета-блокаторами, антагонисты минералокортикоидных рецепторов и ингибиторы натрий-глюкозного котранспортера 2 (ингибиторы (НЗПГ2)).

Вышеуказанные подходы, направленные на блокирование и потенциально на обращение вспять неблагоприятных структурных и/или функциональных изменений сердца при СНнФВ, также снижают риск госпитализации по поводу сердечной недостаточности и смерти. Однако они не устраняют основную патологию СН: снижение сократимости сердца. Также доступны препараты, повышающие сократимость (условно называемые инотропами): они включают ингибиторы фосфодиэстеразы-3 (ФДЭ3) (PDE3) (например, милринон (milrinone)) и адренергические агонисты (например, добутамин (dobutamine)). Как правило, эти агенты действуют за счет увеличения концентрации кальция, что вызывает ряд побочных эффектов, включая увеличение потребности миокарда в кислороде, ишемию, аритмию, а также вызывают чрезмерную гипотензию посредством различных механизмов. В некоторых странах доступен левосимендан (levosimendan), он действует частично за счет повышения чувствительности к кальцию, но он также действует посредством ингибирования ФДЭ3, увеличивая концентрацию кальция и вызывая аритмию, а также действует на сосуды, вызывая гипотонию.

Новый класс инотропов, активаторов миозина, находится в стадии разработки, но есть опасения, что они могут вызывать ишемию и вызывать повышение уровня тропонина, а результаты фазы 3 не предполагают положительного влияния на смертность от сердечно-сосудистых причин (New England Journal of Medicine 2021 Jan 14;384(2): 105-116). Сообщалось о повышении уровня тропонина при сепсисе, заболеваниях почек, тромбоэмболии легочной артерии, сердечной инфекции и сердечной недостаточности, что имело важное прогностическое значение.

Грелин - это гормон, вырабатываемый клетками желудочно-кишечного тракта, который стимулирует высвобождение гормона роста, увеличивает перистальтику/секрецию желудка, а также стимулирует аппетит и потребление пищи. Грелин также участвует в регуляции когнитивного обучения и памяти, связанных с вознаграждением, цикла сна-бодрствования, вкусовых ощущений, поведения, связанного с вознаграждением, и метаболизма глюкозы. Также сообщается о сердечно-сосудистых эффектах грелина: у здоровых субъектов он расширяет артерии, снижает артериальное давление, уменьшает сердечную пост-

нагрузку и увеличивает сердечный выброс (Hypertension, 2014, 64, 450-454). Относительно возможных инотропных эффектов грелина в литературе приводятся противоречивые сообщения. В Endocrinology 2010, 15(1), 4446-4454 сообщалось о том, что перфузия грелина в сердце после ишемии оказывает инотропный эффект на кардиомиоциты. Однако в Peptides, 2006, 27(7), 1616-1623 сообщалось о том, что грелин оказывает отрицательный инотропный эффект, частично опосредованный  $K_{Ca}$ -каналами.

В публикации International Journal of Cardiology, 2009, 137(3), 267-275 сообщается об отсутствии влияния человеческого грелина на сердечную функцию у крысиной модели сердечной недостаточности; аналогичным образом, не было обнаружено инотропных эффектов грелина в изолированных предсердиях с электростимуляцией (Cardiovascular Research, 2006, 69, 227-235).

Стимуляторы секреции гормона роста представляют синтетические пептиды, которые аналогично грелину стимулируют секрецию гормона роста. Некоторые из них могут проявлять сердечно-сосудистые эффекты, такие как повышение коронарного сопротивления, ускорение сердечного ритма и кардиотропные эффекты, причем последний достигается за счет мобилизации кальция (Endocrinology, 2003, 144(11), 5050-5057).

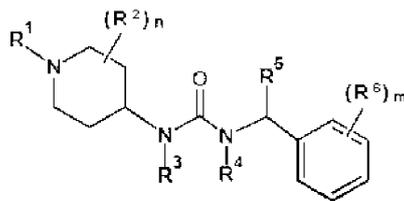
Семейства асимметричных производных мочевины с активностью, модулирующей грелин, описаны в WO2012/116176 и в WO2015/134839 для применения при лечении заболеваний, опосредованных грелином; в этих документах не представлено никаких экспериментальных доказательств каких-либо сердечных эффектов любого из описанных соединений. В последующей патентной заявке WO 2019/179878 описана гидрохлоридная соль 3-(1-(2,3-дихлор-4-метоксифенил)этил)-1-метил-(1,3,3-триметилпиперидин-4-ил)мочевины, обладающая улучшенными свойствами проникновения в мозг и используемая для лечения ряда неврологических расстройств; также сообщается, что это соединение оказывает центрально-опосредованный брадикардический эффект; брадикардия описывается в литературе как возможный фактор, который, если он тяжелый, может способствовать развитию явной сердечной недостаточности, но в легкой форме может служить защитным средством при сердечной недостаточности (European Heart Journal, 1999, 20,252-255).

В публикации Endocrinology, 2010, 151(9), стр. 4446-4454 сообщается об опосредованных кальцием положительных инотропных эффектах грелина (полипептида, состоящего из 28 аминокислот) - естественного стимулятора секреции гормона роста, и его аналога гексарелина; в статье также признается существование противоречивых сообщений об эффектах общего класса средств, стимулирующих секрецию гормона роста, включая сообщения о случаях отрицательных инотропных эффектов.

Принимая во внимание указанное выше в уровне техники, остается высокой потребность в лекарственных средствах, способных решить основную проблему и основную причину СН, то есть, сниженную сократимость сердца, которые являются безопасными и не имеют побочных эффектов, в частности тех побочных эффектов, которые вызваны мобилизацией кальция.

#### Краткое описание

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что соединения, представленные формулой (I)



(I)

где радикалы  $R^1$ - $R^6$  и индексы  $m$ ,  $n$ , определенные в подробном описании, обладают выраженной инотропной активностью в отношении кардиомиоцитов, что делает их полезными для лечения нуждающихся в этом пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Настоящие соединения, которые включают предпочтительно 1-[(1S)-1-(2,3-дихлор-4-метоксифенил)этил]-3-метил-3-[(4R)-1-метил-3,3-диметил-4-пиперидил] мочевины и ее гидрохлоридную соль, таким образом, эффективны при лечении патологических состояний, характеризующихся или связанных со сниженной и/или неэффективной сократительной способностью сердца. Примерами таких состояний являются сердечная недостаточность, сердечный приступ, кардиогенный шок, септический шок, инфаркт миокарда, кардиомиопатия, гипертензия легочной артерии (ЛАГ) (РАН) и тому подобное. Предпочтительным показанием является сердечная недостаточность, которая может быть любого типа (то есть, острой или хронической, и со сниженной или сохраненной фракцией выброса), степень тяжести (легкая, средняя или тяжелая) и стадия (то есть, начальная или развитая). Более предпочтительным показанием является прогрессирующая сердечная недостаточность, острая или хроническая. Наиболее предпочтительным показанием является прогрессирующая сердечная недостаточность, острая или хроническая, со сниженной фракцией выброса (СНнФВ). Предпочтительным примером кардиомиопатии является дила-

тационная кардиомиопатия (ДКМП) (DCM), в частности ДКМП, обусловленная генетическими вариантами (также известная как семейная ДКМП). Предпочтительным примером ЛАГ является ЛАГ с систолической функцией правого желудочка.

Соединения формулы (I), включая соединение 1-[(1S)-1-(2,3-дихлор-4-метоксифенил)этил]-3-метил-3-[(4R)-1-метил-3,3-диметил-4-пиперидил]мочевины и ее гидрохлоридную соль, также полезны тем, что они проявляют инотропную активность, не влияя на мобилизацию кальция: фактически, вместо того, чтобы повышать концентрацию кальция в цитозоле кардиомиоцитов, они действуют путем повышения чувствительности саркомера кардиомиоцитов к существующему уровню кальция. Следовательно, соединения по настоящей патентной заявке обеспечивают значительный инотропный ответ у пациентов, нуждающихся в них, избегая при этом распространенных побочных эффектов известных инотропных средств, вызываемых повышенными концентрациями кальция в цитозоле кардиомиоцитов, кратко называемых здесь «повышенными концентрациями кальция», таких как повышенная потребность в кислороде, тахикардия, аритмия, ишемия и тому подобное. В целом, таким образом, становится доступным новое, безопасное и эффективное инотропное лечение.

#### Описание фигур

Фиг. 1 (вверху): дозозависимое увеличение сократительной способности кардиомиоцитов мыши (верхняя панель), индуцированное AC01/HM01; сократительный эффект AC01/HM01 измерялся на кардиомиоцитах (пустышка (SHAM), то есть, кардиомиоцитах, подвергшиеся процедуре-пустышке без индукции инфаркта миокарда) в различных концентрациях (0,2, 0,5 и 1 мкМ), используя в качестве показателей изменения длины фракции сокращения (ФС (FS)%). AC01/HM01 в концентрации 1 мкМ продемонстрировал наибольший сократительный эффект по сравнению с носителем (\* p<0,05, \*\* p<0,01). Гистограмма показывает среднее значение фракции сокращения N клеток, проанализированных, как указано.

Фиг. 1 (внизу): увеличение сократительной способности, индуцированное AC01/HM01, которое ингибировалось D-Lys3 (специфическим антагонистом грелина), на кардиомиоцитах, выделенных из сердец как мышей-пустышек, так и мышей с сердечной недостаточностью (CH) (мышам была проведена перевязка левой передней нисходящей артерии, вызвавшая инфаркт миокарда; через несколько недель у мышей развилась сердечная недостаточность): сократительная способность кардиомиоцитов повышалась при применении агониста рецептора грелина AC01/HM01 (1 мкМ), в то время как предварительная обработка антагонистом рецептора грелина D-Lys3 -GHRP-6 (3 мкМ) блокировала сократительный эффект. Кардиомиоциты, выделенные как из пустышек (слева), так и из групп ИМ (инфаркт миокарда) (MI) (справа), положительно реагировали на AC01/HM01, увеличивая свою сократительную способность. (\*p<0,05, \*\*p<0,01). Гистограмма показывает среднее значение фракции сокращения N клеток, проанализированных, как указано.

Фиг. 2 (слева и вверху справа): Репрезентативное изображение линейного сканирования (слева) и кривые переходного процесса Ca<sup>2+</sup> (мобилизации) (вверху справа) в кардиомиоцитах, изолированных из сердец -пустышек, получавших носитель или различные концентрации AC01/HM01. Обработка AC01/HM01 не вызвала изменения амплитуд переходных процессов Ca<sup>2+</sup> ни при каких концентрациях, что указывает на то, что повышенная сократительная способность на фиг. 1 обусловлена повышенной чувствительностью к Ca<sup>2+</sup>, а не переходными процессами Ca<sup>2+</sup>.

Фиг. 2 (справа внизу): Гистограммы показывают среднее значение переходных процессов Ca в N клетках, проанализированных, как указано (p = незначимо для всех сравнений)).

Фиг. 3: Репрезентативное линейное сканирование и кривые переходных процессов Ca<sup>2+</sup> в кардиомиоцитах, изолированных из сердец мышей-пустышек. Репрезентативное линейное сканирование переходных процессов Ca<sup>2+</sup> (слева), репрезентативные кривые изменения амплитуды (справа) и средние значения амплитуд переходных процессов Ca<sup>2+</sup> в кардиомиоцитах, изолированных из сердец мышей-пустышек (внизу). Обработка AC01/HM01 (1 мкМ) с D-Lys 3 GHRP-6 или без него не изменяла амплитуду переходного процесса Ca<sup>2+</sup>. Гистограммы показывают среднее значение N клеток, проанализированных, как указано.

Фиг. 4: Уровни Фосфо (Ser 22-23) cTnI, оцененные методом вестерн-блоттинга.

(Вверху): Репрезентативный блот фосфорилированных форм cTnI и общих cTnI. Обработка кардиомиоцитов-пустышек AC01/HM01 (1 мкМ; средняя колонка) снизила уровни фосфорилирования сердечного тропонина I по остаткам серина 22-23. Предварительная обработка антагонистом рецептора грелина D-Lys3- GHRP-6 (3 мкМ, правая колонка) блокировала передачу сигналов, активируемых AC01/HM01 в кардиомиоцитах, и восстановила уровни фосфорилирования cTnI до физиологических уровней, наблюдаемых в кардиомиоцитах, в которые ввели носитель (левая колонка).

(Внизу): Гистограмма, показывающая уровни экспрессии фосфо-TnI, выраженные в виде кратных изменений в кардиомиоцитах, обработанным носителем. Партии кардиомиоцитов (~10<sup>5</sup> клеток) собирали в пробирки и обрабатывали, как указано. Гистограмма показывает среднее значение для N проанализированных партий, как указано (\* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001),

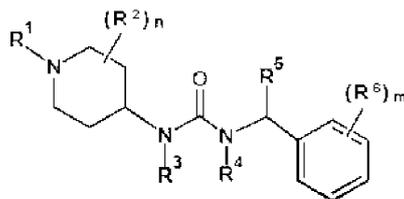
Фиг. 5. Активность протеинкиназы А (ПКА) в изолированных кардиомиоцитах. Кардиомиоциты, в которые ввели AC01/HM01 (1 мкМ), демонстрировали снижение активности ПКА (ПКА) (серая полоска). D-Lys 3 -GHRP-6 блокировал внутриклеточную передачу сигналов AC01/HM01 и восстанавливал актив-

ность ПКА до физиологических уровней (красная полоска), аналогично кардиомиоцитам, обработанным носителем (белая полоска). Партии кардиомиоцитов ( $\sim 10^5$  клеток) собирали в пробирки и обрабатывали, как указано. Гистограмма показывает среднее значение для N партий.

Фиг. 6. Молекулярная передача сигналов, запускаемая взаимодействием AC01/HM01 и рецептора грелина: AC01/HM01 активирует передачу сигналов Gαi, которая связана со сниженной активностью ПКА и сниженным фосфорилированием cTnI по серину 22-23. Этот механизм ответственен за повышенную чувствительность к  $Ca^{2+}$  в кардиомиоцитах и улучшенную сократительную способность после стимуляции AC01/HM01.

#### Подробное описание

Первой основной задачей настоящего изобретения является получение соединения формулы (I) или фармацевтически приемлемой соли соединения формулы (I) для использования в качестве инотропного средства



(I)

В настоящей формуле (I):

$R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^5$  - независимо друг от друга представляют собой  $C_1$ - $C_6$ -алкил,

$R^1$ ,  $R^4$  - независимо друг от друга представляют собой водород или  $C_1$ - $C_6$ -алкил,

$R^6$  представляет собой  $C_1$ - $C_6$ -алкил, гало,  $C_1$ - $C_6$ -алкокси или  $C_1$ - $C_6$ -галоалкил,

n представляет собой 2-3,

m представляет собой 1-3.

В целом в настоящей формуле (I): используемый термин "алкил" включает оба, линейный и разветвленный алкил; используемые термины " $C_1$ - $C_n$ " раскрывают каждый из единичных гомологов диапазона 1-n, например, используемый термин  $C_1$ - $C_6$ -эквивалентен  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$ ,  $C_4$ ,  $C_5$ ,  $C_6$ .

В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения,  $R^4$  представляет собой водород.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения  $R^4$  представляет собой водород, и n представляет собой 2.

В еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения  $R^4$  представляет собой водород, n представляет собой 2, и  $R^2$  представляет собой метил.

В другом более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения  $R^4$  представляет собой водород, n представляет собой 2,  $R^2$  представляет собой метил, и две  $R^2$  группы присоединены к одному и тому же атому углерода пиперидинового кольца, в частности, к атому углерода, который непосредственно не связан с атомом азота пиперидина, то есть, они присоединены к 3-ил положению пиперидинового кольца (что эквивалентно 5-ил положению).

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения все представленные выше варианты его осуществления могут дополнительно характеризоваться одним или более, предпочтительно всеми, из следующих условий:

оба  $R^3$  и  $R^5$  представляют собой  $C_1$ - $C_3$ -алкил, предпочтительно метил,

m представляет собой 3,

$R^6$  представляет собой гало и/или алкокси, предпочтительно по меньшей мере один  $R^6$  представляет собой алкокси.

Соединения формулы (I), в которых  $R^1$  представляет собой  $C_1$ - $C_6$ -алкил, представляют собой общеприменимый вариант; в качестве альтернативы, соединения формулы (I), в которых  $R^1$  представляет собой водород, представляют собой другой общеприменимый вариант.

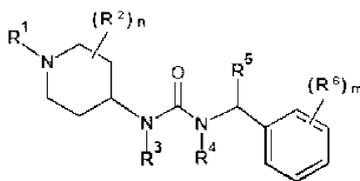
Используемый термин "гало" обозначает здесь хлор, фтор, бром или йод; как правило, используемый термин "гало" указывает на хлор; как правило, используемый термин "алкокси" указывает на метокси или этокси.

Используемый термин "фармацевтически приемлемая соль" означает здесь любую соль, которая обычно считается нетоксичной в фармацевтической практике;

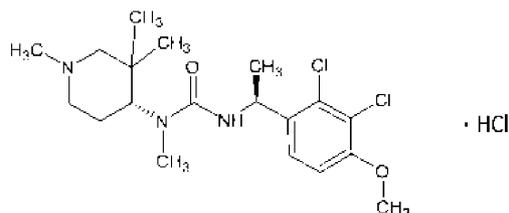
в частности, поскольку соединения формулы (I) являются солеобразующими аминами, любая подходящая солеобразующая кислота может быть использована в фармацевтической практике для образования фармацевтически приемлемой соли из свободного основания формулы (I): типичная фармацевтически приемлемая соль представляет соль соляной кислоты (гидрохлорид), в частности моногидрохлорид.

Соединения формулы (I) содержат два асимметричных атома углерода и могут существовать в раз-

личных стереоизомерных формах и их смесях, все они представлены настоящей формулой (I); среди них предпочтительной является форма 1(S), 4(R), которая соответствует структуре:



где  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $m$  и  $n$  имеют значения, определенные выше. В по существу предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения соединение формулы (I) представляет собой 1-[(1S)-1-(2,3-дихлор-4-метоксифенил)этил]-3-метил-3-[(4R)-1-метил-3,3-диметил-4-пиперидил]-мочевину или ее фармацевтически приемлемую соль, в частности моногидрохлоридную соль, имеющую следующую структуру (Ia):



(Ia)

Соединение со структурой (Ia) как таковое известно, например, из *Frontiers in Pharmacology*, 2018, Том 9, статья 869, стр. 1-16, и здесь сокращенно упоминается как AC01 или HM01, взаимозаменяемо.

Используемый в описании термин "инотропный агент", наряду с используемыми терминами "инотропная активность" или "инотропный эффект" при упоминании активности соединений настоящей формулы (I) указывают, что рассматриваемое соединение способно стимулировать, то есть, усиливать сократительную способность и силу сердца пациента. Используемый термин инотропный означает здесь "положительную" инотропную активность, то есть, воздействие на мышцу является стимулирующим и не распространяется на противоположный отрицательный инотропный эффект. Инотропная активность соединений по настоящей патентной заявке эффективна в отношении клеток сердечной мышцы, то есть, клеток миокарда, что приводит к усиленной сократительной способности соответствующего мышечного органа, то есть, сердца. Повышенная сократительная способность улучшает функциональность сердца, в частности силу его сокращений, что приводит к повышению насосной способности с последующим улучшением доставки крови и насыщения кислородом различных участков тела.

В отличие от доступных инотропных агентов, инотропный эффект соединений по настоящей патентной заявке формулы (I) не опосредован увеличением концентраций кальция; этот эффект экспериментально подтверждается отсутствием увеличения концентраций кальция в цитозоле кардиомиоцитов, то есть, отсутствием высвобождения и потока кальция из внеклеточного пространства и саркоплазматического ретикулума. Таким образом, неожиданно было обнаружено, что эти соединения обладают сократительной эффективностью без увеличения базальных концентраций кальция в мышечной клетке, то есть, они скорее повышают чувствительность клеток к существующим уровням кальция. Следовательно, используемый термин "инотропный агент" может быть более точно определен, как "основанный на сенсибилизации к кальцию" инотропный агент или, в качестве альтернативы, как "нейтральный по уровню кальция" инотропный агент. Следовательно, соответствующая инотропная активность, типичная соединений по настоящей патентной заявке формулы (I), выгодно отличается от таковой у доступных инотропных препаратов тем, что она не включает побочные эффекты, обусловленные повышенной концентрацией кальция в клетках, такие как повышенная потребность миокарда в кислороде, ишемия, аритмия и чрезмерная артериальная гипотензия и тому подобное. Таким образом, рассматриваемое медицинское применение дополнительно характеризуется, как не имеющее вышеуказанных побочных эффектов, связанных с повышенной концентрацией кальция в клетках.

Соединения по настоящей патентной заявке формулы (I) эффективны для применения при лечении любых патологических состояний пациента человека или животного, характеризующихся или связанных со сниженной и/или неэффективной сократительной способностью сердца. Примерами этих состояний являются сердечная недостаточность (также известная как застойная сердечная недостаточность), сердечный приступ, кардиогенный шок, септический шок, инфаркт миокарда, кардиомиопатия, гипертензия легочной артерии (ЛАГ) и аналогичное им. Предпочтительным показанием является сердечная недостаточность, она может быть любого типа (то есть, острой или хронической, со сниженной или сохраненной фракцией выброса), степени тяжести (легкой, среднетяжелой или тяжелой) и стадии (то есть, начальной

или прогрессирующей). Состоянием сердечной недостаточности, при котором настоящее лечение особенно необходимо/эффективно, является сердечная недостаточность со сниженной фракцией выброса (СНнФВ), в частности прогрессирующая СНнФВ, указанная сердечная недостаточность является либо острой, либо хронической. Особенно показанной для лечения является хроническая СНнФВ, как на начальной, так и на поздней стадии. Предпочтительным примером кардиомиопатии является дилатационная кардиомиопатия (ДКМП), в частности, ДКМП, обусловленная генетическими вариантами (также известная как семейная ДКМП). Предпочтительным примером ЛАГ является ЛАГ с систолической функцией правого желудочка.

Применение по настоящей патентной заявке по существу эффективно при состояниях, которые требуют длительного лечения инотропными агентами, таких как хронические формы сердечной недостаточности, во всех этих случаях предотвращение сопутствующего развития побочных эффектов, связанных с кальцием, особенно полезно для пациента, поскольку оно предотвращает длительное воздействие кальция, опасные последствия, которые могут привести к летальному исходу в долгосрочной перспективе, что делает доступной более безопасную инотропную терапию с выживанием в более долгосрочной перспективе.

Следовательно, в предпочтительном варианте осуществления настоящей патентной заявки медицинское применение преимущественно направлено на субпопуляцию пациентов, для которых особенно следует избегать побочных эффектов, связанных с повышенной концентрацией кальция в кардиомиоцитах, то есть, пациентов, которые имели, имеют или находятся в группе риска развития ишемии, аритмии и/или гипотензии, что соответствует подгруппе более ослабленных пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, для которых возникновение вышеуказанных побочных эффектов может быть очень опасным и, возможно, смертельным.

Сердечная недостаточность, рассматриваемая здесь, может быть вызвана любыми заболеваниями, которые ослабляют сердечную мышцу, или заболеваниями, которые вызывают ригидность сердечных мышц, или заболеваниями, которые увеличивают потребность тканей организма в кислороде сверх способности сердца доставлять его. Многие заболевания могут нарушать насосную функцию желудочков сердца. Например, мышцы желудочков могут быть ослаблены перенесенными ранее сердечными приступами или воспалением (миокардитом), что со временем приводит к прогрессирующей сердечной недостаточности. Снижение насосной способности желудочков из-за мышечного ослабления называется систолической дисфункцией. После каждого сокращения желудочков (систола) мышцы желудочков должны расслабиться, чтобы кровь из предсердий могла заполнить желудочки. Такое расслабление желудочков называется диастолой. Такие заболевания, как гемохроматоз или амилоидоз, могут вызывать уплотнение сердечной мышцы и ухудшать способность желудочков расслабляться и наполняться; это называется диастолической дисфункцией. Наиболее распространенной причиной этого является длительное высокое кровяное давление, приводящее к утолщению (гипертрофии) сердца. Кроме того, хотя у некоторых пациентов, насосная функция и наполняющая способность сердца могут быть нормальными, аномально высокая потребность тканей организма в кислороде (например, при гипертиреозе) может затруднить обеспечение адекватного кровотока сердцем (так называемое сердечная недостаточность с высоким выбросом). У некоторых пациентов может присутствовать один или несколько из этих факторов, вызывающих застойную сердечную недостаточность. Застойная сердечная недостаточность может поражать многие органы тела. Например, ослабленная сердечная мышца может быть не в состоянии снабжать почки достаточным количеством крови, которые затем начинают терять нормальную способность выводить соль (натрий) и воду. Это снижение функции почек может привести к тому, что организм задержит больше жидкости. Легкие могут переполниться жидкостью (отек легких), и способность человека выполнять физические упражнения снижается. Жидкость также может накапливаться в печени, тем самым ухудшая ее способность очищать организм от токсинов и производить незаменимые белки. Эффективность абсорбции кишечником питательных веществ и лекарств может снизиться. Со временем, при отсутствии лечения или даже при оптимальном лечении существующими методами лечения, ухудшение застойной сердечной недостаточности затронет практически каждый орган в организме. Это происходит независимо от первопричины, приведшей к последующему развитию сердечной недостаточности. Таким образом, лечение по настоящей патентной заявке дополнительно направлено на лечение всех вышеуказанных симптомов и последствий сердечной недостаточности.

Настоящая патентная заявка дополнительно относится к применению соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли, как указано выше, при производстве инотропного лекарственного средства для лечения любого из вышеуказанных патологических состояний. Дополнительно настоящая патентная заявка относится к способу лечения любого из вышеуказанных патологических состояний, включающему введение соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли субъекту, нуждающемуся в этом.

Подходящие субъекты, которым предназначено лечение по настоящей патентной заявке, включают млекопитающих. К млекопитающим относятся люди любого пола и на любой стадии развития, млекопитающие дополнительно включают, помимо прочего, собак, кошек, крупный рогатый скот, коз, лошадей, овец, свиней, грызунов, зайцеобразных, приматов и тому подобное, и включают млекопитающих в пери-

од внутриутробного развития.

Используемые диапазоны доз могут предпочтительно составлять от 0,1 до 10 мг/день, например от 0,2 до 10 мг/день; суточная доза может быть разделена на более чем одно ежедневное введение, включая два ежедневных введения, например, от 0,1 до 5 мг два раза в день (дважды в сутки).

Соединения по настоящему изобретению формулы (I) могут быть приготовлены в фармацевтически приемлемых лекарственных формах, подходящих для введения указанных выше суточных доз. Например, они могут содержать соединение формулы (I) в количествах, варьирующихся от 0,1 до 10 мг, или часть этого количества, если предназначены для многократного ежедневного введения.

Специалист в области техники, к которой относится настоящее изобретение, может без излишних экспериментов, и полагаясь на личные знания и описание настоящей патентной заявки, оптимизировать эти диапазоны в отношении конкретной фармацевтической формы, которая будет производиться.

Твердая дозированная форма для перорального введения может быть, например, представлена в виде отдельных единиц, таких как твердые или мягкие капсулы, пилюли, пакетики, пастилки, саше, таблетки или мини-таблетки, каждая из которых содержит заданное количество по меньшей мере одного из соединений по настоящему изобретению. В некоторых формах пероральное введение может осуществляться в виде порошка или гранул. В некоторых формах форма пероральной дозы является сублингвальной, такой как, например, пастилка или оральная пленка для приема внутрь. В таких твердых дозированных формах соединения формулы I обычно комбинируют с одним или несколькими вспомогательными веществами. Такие капсулы или таблетки могут представлять препараты с контролируемым высвобождением. В случае капсул, таблеток, мини-таблеток и пилюль лекарственные формы также могут содержать буферные агенты или могут быть приготовлены с кишечнорастворимыми покрытиями.

Жидкие дозированные формы для перорального введения включают, например, фармацевтически приемлемые эмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры, содержащие инертные разбавители, обычно используемые в области техники, к которой относится настоящая патентная заявка (например, воду). Такие композиции также могут содержать вспомогательные вещества, такие как смачивающие, эмульгирующие агенты, суспендирующие агенты, ароматизаторы (например, подсластители) и/или души.

В некоторых формах композиции по настоящей патентной заявке могут включать форму парентеральной дозы. "Парентеральное введение" включает, например, подкожные инъекции, внутривенные инъекции, внутрибрюшинные, внутримышечные инъекции, внутрижелудочные инъекции и инфузию. Препараты для инъекций (например, стерильные водные или маслянистые суспензии для инъекций) могут быть приготовлены в соответствии с известным уровнем техники с использованием подходящих диспергирующих, смачивающих агентов и/или суспендирующих агентов.

Как правило, в составе используется соответствующее количество фармацевтически приемлемого носителя для придания составу изотонического состояния. Примеры фармацевтически приемлемого носителя включают без ограничения, физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Другие приемлемые вспомогательные вещества включают без ограничения, загустители, разбавители, буферы, консерванты, поверхностно-активные вещества и аналогичное им.

Указанные соединения могут вводиться любым подходящим способом, преимущественно в форме фармацевтической композиции, адаптированной к такому способу, и в дозе, эффективной для предполагаемого лечения или профилактики. Активные соединения и композиции, например, можно вводить следующими путями и способами введения: перорально, ректально, парентерально, через глаза, ингаляционно или местно. В частности, введение может быть: подкожным, ингаляционным, посредством клизмы, конъюнктивальным, посредством глазных капель, посредством ушных капель, альвеолярным, назальным, интраназальным, вагинальным, интравагинальным, трансвагинальным, через глаза, внутриглазным способом, чрескожным, энтеральным, пероральным, внутриротовым, трансоральным, кишечным, ректальным, интравенальным, трансректально-ректальным, инъекционным, инфузионным, внутривенным, внутриартериальным, внутримышечным, внутримозговым, внутрижелудочковым, внутримозгово-желудочковым, внутрисердечным, подкожным, внутрикостным, внутрикожным, интратекальным, внутрибрюшинным, внутрипузырным, интракавернозным, интрамедуллярным, внутриглазным, внутричерепным, чрескожным, трансмукозальным, трансназальным, ингаляционным, интрацистернальным, эпидуральным, перидуральным, интравитреальным и аналогичное им. Предпочтительным способом введения является пероральный или внутривенный.

Соединения по настоящей патентной заявке формулы (I), как правило, вводят в терапевтически эффективных количествах. Терапевтически эффективное количество может широко варьироваться в зависимости от тяжести заболевания, возраста и относительного состояния здоровья субъекта, активности используемого соединения и других факторов.

Терапевтически эффективные количества соединений формулы (I) могут варьироваться от около 0,001 мг/кг массы тела до около 0,1 мг/кг массы тела, предпочтительно от около 0,001 мг/кг массы тела до около 0,01 мг/кг массы тела. Специалист в области техники, к которой относится настоящее изобретение, может без излишних экспериментов, и полагаясь на личные знания и описание настоящей патентной заявки, оптимизировать эти диапазоны в отношении каждого из различных патологических состояний,

указанных выше.

По всему настоящему описанию приводятся ссылки на различные публикации. Содержание этих публикаций во всей их полноте включено ссылками в настоящее описание, чтобы более полно описать уровень техники, к которому это относится. Приведенные ссылки также индивидуально и специально включены в настоящий документ посредством ссылки на содержащийся в них материал, который обсуждается в предложении, в котором используется ссылка.

Используемые в описании и прилагаемой формуле настоящей патентной заявки формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Так, например, ссылка на лечение "патологического состояния" включает лечение двух или более таких состояний, даже если они возникают одновременно у одного и того же субъекта.

Слово "или" или подобные термины, используемые в описании настоящей патентной заявки, означают любого одного члена определенного списка, а также включают любую комбинацию членов этого списка.

"Необязательный" или "необязательно" означает, что впоследствии описанное событие или обстоятельство может произойти, а может и не произойти, и что описание включает случаи, когда указанное событие или обстоятельство происходит, и случаи, когда оно не происходит.

Используемый термин "около" при использовании его для изменения значения любого параметра и его диапазонов, относится к экспериментальным изменениям числовой величины, которые могут возникать, например, в результате типичных процедур измерения и обращения, используемых для приготовления соединений, композиций и аналогичное им; из-за непреднамеренной ошибки в этих процедурах; из-за различий в производстве, источнике или чистоте исходных материалов или ингредиентов, используемых для осуществления методов; и аналогичные факторы. Используемый термин "около" также включает в объем понятия количества, которые отличаются из-за изменения со временем композиции или рецептуры с конкретной начальной концентрацией или смесью, и количества, которые отличаются из-за смешивания или обработки композиции или рецептуры с конкретной начальной концентрацией или смесью. Все эти экспериментальные отклонения обычно находятся в пределах  $\pm 5\%$  от заданного значения. Независимо от того, изменена ли используемым термином "около" приложенная к настоящему документу формула изобретения, она включает эквиваленты этих величин.

Используемый термин "содержит" и варианты этого слова, такие как "содержащий" и "содержит", означают "включая, помимо прочего", и не предназначены для исключения, например, других добавок, компонентов, целых чисел или стадий.

Используемый в описании термин "проведение лечения" или "лечение" означает медицинское наблюдение за пациентом с намерением вылечить, улучшить состояние, стабилизировать или предотвратить заболевание, патологическое состояние или расстройство. Эти термины включают активное лечение, то есть лечение, направленное конкретно на улучшение состояния после заболевания, патологического состояния или расстройства, а также включают этиотропное лечение, то есть лечение, направленное на устранение причины сопутствующего заболевания, патологического состояния или расстройства, с восстановлением исходных параметров организма пациента до заболевания, включая увеличение любого параметра, который был патологически снижен, такого как сократительная способность сердца. Эти термины могут означать, что симптомы основного заболевания уменьшаются, и/или что одна или несколько основных клеточных, физиологических или биохимических причин или механизмов, вызывающих симптомы, уменьшаются. Понятно, что используемый в данном контексте "уменьшенный" означает относящийся к состоянию заболевания, включая молекулярное состояние заболевания, а не только физиологическое состояние заболевания. Кроме того, эти термины включают паллиативное лечение, то есть лечение, направленное на облегчение симптомов, а не на излечение заболевания, патологического состояния или расстройства; профилактическое лечение, то есть лечение, направленное на сведение к минимуму или частичное или полное ингибирование развития связанного заболевания, патологического состояния или расстройства; и поддерживающее лечение, то есть лечение, применяемое в дополнение к другой специфической терапии, направленной на улучшение сопутствующего заболевания, патологического состояния или расстройства. Эти термины означают, как лечение, имеющее лечебную или облегчающую цель, так и лечение, имеющее профилактическую цель. Может проводиться лечение как острых, так и хронических состояний. Понятно, что лечение может означать уменьшение одного или более симптомов или характеристик по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 99,9%, 99,99%, 100% по сравнению с контролем. В контексте этих терминов профилактика относится к способности соединения или композиции (такой как соединения и композиции по настоящей патентной заявке) предотвращать заболевание, определенное в настоящем документе, у пациентов, у которых диагностировано заболевание, или которые подвержены риску развития такого заболевания. В этом контексте профилактика включает отсрочку начала заболевания по сравнению с контролем. Эти термины не требуют, чтобы лечение действительно было эффективным для получения каких-либо из предполагаемых результатов. Достаточно, чтобы результаты были предполагаемыми.

В описании могут быть использованы сокращения, которые хорошо известны специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение, (например, "ч" для обозначения часа или часов,

"г" или "гм" для грамма (ов), "мл" для миллилитров и "кт" для комнатной температуры, "нм" для нанометров, "М" для молей и тому подобные сокращения).

Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в области техники, к которой относится настоящее изобретение, полное раскрытие и описание того, как производятся и оцениваются соединения, композиции, изделия, устройства и/или способы, заявленные в настоящем документе, и являются неограничивающими примерами. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении цифр (например, количества, температуры и аналогичное им), но следует учитывать некоторые ошибки и отклонения. Если не указано иное, части указаны по весу, температура указана в °С и если не указано иное, температура является комнатной, а давление равно атмосферному давлению или близко к нему.

Экспериментальная часть

Пример 1

Воздействие NM01 на кардиомиоциты мышинной модели сердечной недостаточности, вызванной инфарктом миокарда, и контрольных мышей

Методы

Этическое одобрение исследований на животных

Исследования проводились в Каролинском институте (Karolinska Institutet), Стокгольм, Швеция. Исследование было одобрено Северным этическим комитетом Стокгольма по экспериментам на животных (Stockholm North Ethical Committee on Animal Experiments). Эксперименты на животных проводились в соответствии со шведским законом о защите животных (Swedish Animal Welfare Act), шведским постановлением о социальном обеспечении (Swedish Welfare ordinance), а также рекомендациями и применимыми нормативными актами шведских властей (этическое разрешение 2155-2020 и N273-15) (Ethical permit 2155-2020 and N273-15). Эксперименты на животных соответствовали основным положениям Директивы 2010/63/ЕС Европейского парламента о защите животных, используемых в научных целях (Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes). Мышей содержали при 12-часовом цикле свет/темнота и обеспечивали пищей и водой без ограничения.

Мышиная модель сердечной недостаточности, вызванной инфарктом миокарда

Мышей C57BL/6 в возрасте 12-16 недель анестезировали газовой смесью кислорода и изофлурана. Инфаркт миокарда (ИМ) был вызван постоянной перевязкой левой коронарной артерии, как указано выше. Животные-пустышки были прооперированы аналогично, но без перевязки коронарной артерии. Животных умерщвляли через 4 недели после процедуры, когда в группе ИМ были очевидны признаки сердечной недостаточности (СН): эхокардиография показала уменьшенное фракционное укорочение левого желудочка (ФУ) и неконтрактильную инфарктированную переднюю стенку (%ФУ ИМ=29,3±1,1, пустышка =61,4±2,1). После введения седативных препаратов мышей подвергали эвтаназии путем смещения шейных позвонков, а сердца собирали и обрабатывали для изолирования кардиомиоцитов. Отношение массы сердца к массе тела использовалось в качестве параметра для оценки гипертрофии сердца (масса сердца/масса тела ИМ=9,5±1,3 пустышка=6,0±0,4). Более того, в сердце мышей с ИМ выявлена область некротического инфаркта на передней стенке ЛЖ, ниже коронарной окклюзии, покрывающая около 1/3 левого желудочка. В общей сложности для исследования использовали 5 мышей -пустышек и 3 мышей с ИМ.

Изоляция кардиомиоцитов

Кардиомиоциты были свежо изолированы из желудочков сердца отдельно у мышей-пустышек и мышей СН в соответствии с протоколом, разработанным Альянсом по клеточной сигнализации (Alliance for Cellular Signalling) (идентификатор протокола процедуры AfCS PP00000125). Из каждого из 5 сердец пустышек и 3 сердец СН была приготовлена клеточная суспензия и разделена на 10 аликвот каждая, в общей сложности 50 аликвот из сердец-пустышек и 30 аликвот из сердец СН. Эти аликвоты обрабатывали носителем AC01/NM01 или D-Lys3-GHRP-6 +AC01/NM01, как указано, и использовали для последующих физиологических и биохимических экспериментов.

Реагенты

AC01/NM01 суспендировали в физиологическом растворе фосфатного буфера (PBS: в мм: NaCl 137, KCl 7, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 М) и разбавляли до получения 3 различных концентраций: 0,2, 0,5 или 1 мкМ в растворе Тирода. Был использован диапазон концентраций в пределах 0,2-1 мкМ, чтобы убедиться, что рецептор активирован. D-Lys 3 GHRP-6 (антагонист рецептора грелина; Sigma Aldrich, Stockholm, Sweden; IC<sub>50</sub> для антагонистической активности = 0,9 мкМ) суспендировали в PBS и использовали при 3 мкМ в качестве конечной концентрации в растворе Тирода (в мм: NaCl 121, KCl 5,0, CaCl<sub>2</sub> 1,8, MgCl<sub>2</sub> 0,5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4, NaHCO<sub>3</sub> 24, ЭДТА 0,1, глюкоза 5,5). Перед измерениями сократительной способности и передачи сигналов Ca<sup>2+</sup> и биохимическими анализами суспензии кардиомиоцитов из сердец-пустышек и сердец с СН рандомизировали по 3 типам обработки: носитель, AC01/NM01 или D-Lys3-GHRP-6 + AC01/NM01. Обработку различными агентами проводили в течение 15 минут при комнатной температуре. Некоторые аликвоты клеточной суспензии подвергали мгновенной заморозке жидким N<sub>2</sub> и хранили при температуре -80°C для последующего биохимического анализа. Все эксперименты по обра-

ботке кардиомиоцитов проводились вслепую.

#### Конфокальная визуализация

Свеже изолированные кардиомиоциты разделили на аликвоты в пробирки объемом 1,5 мл и инкубировали с проницаемой для клеток формой флуоресцентного индикатора  $\text{Ca}^{2+}$  Fluo-3 AM с последующей промывкой в течение >5 мин. Перед стимуляцией различными реагентами клетки помещали в чашки со стеклянным дном, покрытые ламином (Mattek, Ashland, MA, USA), которые представляют специально изготовленную камеру для перфузии/стимуляции, и непрерывно перфузировали  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  (95/5%) барботированным раствором Тирода со следующей композицией (в mM: NaCl 121, KCl 5,0,  $\text{CaCl}_2$  1,8,  $\text{MgCl}_2$  0,5,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,4,  $\text{NaHCO}_3$  24, EDTA 0,1, глюкоза 5,5), который представляет раствор носителя. 15 партий из пустышек и 9 партий из СН кардиомиоцитов рандомизировали для различных обработок: носитель, AC01/HM01 (0,2, 0,5 или 1 мкМ) или предварительная обработка D-Lys3-GHPR-6 (3 мкМ) с последующей обработкой AC01/HM01 (1 мкМ). Кардиомиоциты для сокращения стимулировали при сверхпороговом напряжении с частотой 1 Гц при использовании электрического поля между двумя платиновыми электродами, прикрепленными к камере перфузии/стимуляции. Флуоресцентные изображения линейного сканирования были получены при использовании конфокального микроскопа (BioRad; 40-кратные масляные иммерсионные линзы) только на кардиомиоцитах, которые сокращались при электрической стимуляции и имели нормальную морфологию (например, поперечнополосатые, в форме "кирпича"). Клетки, которые демонстрировали спонтанные сокращения, не анализировались. Для количественной оценки изменений флуоресценции (переходные процессы  $\text{Ca}^{2+}$ ) и сократительной способности отдельных кардиомиоцитов использовали программное обеспечение ImageJ (программное обеспечение с открытым исходным кодом, разработанное NIH, Bethesda, USA).

#### Измерение сократительной способности кардиомиоцитов

Свеже изолированные кардиомиоциты разделили на аликвоты в пробирки объемом 1,5 мл и инкубировали с проницаемой для клеток формой флуоресцентного индикатора  $\text{Ca}^{2+}$  Fluo-3 AM в течение около 20 минут с последующей промывкой в течение >5 минут. Клетки помещали в чашки со стеклянным дном, покрытым ламином (35 мм, Mattek, Ashland, MA, USA), а затем устанавливали в специально изготовленную камеру для перфузии/стимуляции. Клетки непрерывно перфузировали  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  (95/5%) барботированным раствором Тирода со следующей композицией (в mM): NaCl 121, KCl 5,0,  $\text{CaCl}_2$  1,8,  $\text{MgCl}_2$  0,5,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,4,  $\text{NaHCO}_3$  24, EDTA 0,1, глюкоза 5,5, который представляет собой раствор-носитель.

15 аликвот суспензии кардиомиоцитов пустышек и 9 аликвот СН рандомизировали для различных обработок: носитель, AC01/HM01 (0,2, 0,5 или 1 мкМ) или предварительная обработка D-Lys3-GHPR-6 (3 мкМ) с последующей обработкой AC01/HM01 (1 мкМ). Кардиомиоциты для сокращения подвергались электрической стимуляции при сверхпороговом напряжении с частотой 1 Гц с использованием двух платиновых электродов, присоединенных к камере перфузии/стимуляции. Флуоресцентные изображения линейного сканирования были получены при использовании конфокального микроскопа (Bio Rad; 40-кратные масляные иммерсионные линзы). Фиксировали изображения только от кардиомиоцитов, которые сокращались при электрической стимуляции и имели нормальную морфологию (например, поперечнополосатые, в форме "кирпича"). Клетки, которые демонстрировали спонтанные сокращения, не анализировались. Для количественной оценки изменений флуоресценции (переходные процессы  $\text{Ca}^{2+}$ ) и сократительной способности отдельных кардиомиоцитов использовали программное обеспечение ImageJ (программное обеспечение с открытым исходным кодом, разработанное NIH, Bethesda, USA).

#### Измерение внутриклеточного $\text{Ca}^{2+}$

Переходные процессы  $\text{Ca}^{2+}$  измеряли при использовании конфокального микроскопа (Bio Rad) в режиме линейного сканирования. Для возбуждения использовали длину волны 491 нм, а излучаемый свет собирали при длине волны >515 нм. Линейное сканирование было ориентировано вдоль длинной оси кардиомиоцита. Флуоресцентный сигнал ( $F/F_0$ ) рассчитывали как отношение между флуоресценцией покоя перед началом переходного процесса  $\text{Ca}^{2+}$  ( $F_0$ ) и пиковой флуоресценцией ( $F$ ) переходного процесса  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### Измерение сократительной способности кардиомиоцитов

Сократительную способность кардиомиоцитов измеряли, как процент укорочения длины (фракционное укорочение; %FS). Выделенные кардиомиоциты подвергали воздействию в перфузионной камере вышеуказанными реагентами: носителем или AC0/HM01 (0,2, 0,5 или 1 мкМ в растворе Тирода), с антагонистом рецептора грелина D-Lys3-GHPR-6 и без него (3 мкМ в растворе Тирода).

#### Иммуноблоттинг белков

Аликвоты замороженных суспензий кардиомиоцитов лизировали при использовании буфера NP40 (Thermo Fisher FNN0021, Stockholm, Sweden), дополненного ингибиторами фосфатазы (Sigma-Aldrich P2850-1 мл, P5726-1 мл, Stockholm, Sweden). Белковые лизаты разделяли электрофорезом и переносили на мембраны. Мембраны инкубировали с первичными антителами: кроличьим антителом против фосфо (Ser 22-23) сердечного тропонина I (cTnI, Cell Signalling, Leiden, The Netherlands #4004S) и кроличьими антителами к cTnI (Cell Signalling #4002S, Leiden, The Netherlands). После этого использовали вторичные антитела, меченные инфракрасным излучением (IRDye 680 и IRDye 800, 1:5000, Licor). Иммунореактив-

ные полосы анализировали при использовании инфракрасной системы визуализации Odyssey (Li-Cor, Bad Homburg, Germany). Плотности полос определяли количественно при использовании ImageJ (NIH, Bethesda, USA), нормализовали по общему cTnI, и окончательные данные выражали в виде кратного увеличения по сравнению с полосами, представляющими белок, выделенный из клеток, обработанных носителем.

#### Анализ активности ПКА в кардиомиоцитах

Для определения активности ПКА в кардиомиоцитах использовали набор для анализа активности киназы ПКА на основе (ab139435, Abcam, Cambridge, UK). Аликвоты замороженных кардиомиоцитов размораживали и смешивали с буфером для лизиса, содержащим (мМ) следующее: 20 MOPS, 50 β-глицеролфосфата, 5 ЭГТК, 2 ЭДТА, 1 бензамидина, 1 ортованадата натрия, 1% NP40, 1 ДТТ, полный коктейль ингибиторов протеазы (Roche Diagnostics, West Sussex, UK) и коктейль из ингибиторов фосфатазы № 3 (Sigma, Gillingham, UK). Около 2 мкг белка из каждого образца анализировали в соответствии с инструкциями изготовителя 27.

#### Статистика

Статистическое сравнение между 2 группами проводили с использованием t-критерия Стьюдента (непарного). Для сравнения между >2 группами использовали анализ ANOVA. Статистической значимостью считали значение  $p < 0,05$ . Средние данные были представлены в виде среднего ± стандартной ошибки среднего (SEM). На фигурах значения P указаны, как следующее: \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ .

#### Результаты

АС01/НМ01 повышает сократительную способность кардиомиоцитов (фиг. 1)

Сократительную способность измеряли на изолированных кардиомиоцитах в ответ на АС01/НМ01 в различных концентрациях (0,2, 0,5 и 1 мкМ) по сравнению с носителем. На фиг. 1 сверху показано, что сократительная способность кардиомиоцитов пустышек, измеренная, как процент фракционного укорочения длины (ФУ %), была увеличена дозозависимым образом со значительным и статистически значимым ответом при 0,5 и 1 мкМ АС01/НМ01. На фиг. 1 внизу показано, что кардиомиоциты, обработанные АС01/НМ01 (1 мкМ) продемонстрировали значительное увеличение сократительной способности, выраженное в процентах от фракционного укорочения (ФУ %) по сравнению с носителем как у пустышек, так и у СН, и что предварительная обработка антагонистом рецептора грелина, D-Lys 3 GHRP-6 (3 мкМ), блокировала сократительный эффект АС01/НМ01, предполагая, что молекулярный механизм специфичен для передачи сигналов рецепторами грелина.

Использовались кардиомиоциты, выделенные как у контрольных мышечей (пустышки), так и у мышечей с сердечной недостаточностью (СН), вызванной инфарктом миокарда, для измерения сократительной способности. Не связанная с лечением АС01/НМ01 сократительная способность кардиомиоцитов, по-видимому, была выше в кардиомиоцитах СН по сравнению с пустышками. Жизнеспособные кардиомиоциты из СН, вызванной ИМ, полученные из неишемизированной части сердца, компенсируют инфаркт/некротический миокард, улучшая их сократительную способность за счет усиления циркуляции  $Ca^{2+}$  и чувствительности миофиламентов. Однако увеличение сократительной способности, индуцированное АС01/НМ01 по сравнению с кардиомиоцитами, обработанными носителем, наблюдалось как у пустышек, так и у СН, что позволяет предположить, что эта молекула может дополнительно улучшать сократительную способность независимо от состояния кардиомиоцитов.

АС01/НМ01 повышает сократительную способность кардиомиоцитов без увеличения амплитуды переходных процессов  $Ca^{2+}$  (фиг. 2; фиг. 3)

Все клинически доступные инотропы повышают сократительную способность за счет увеличения внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$ , который несет ответственность за их неблагоприятный профиль безопасности, поэтому было неожиданностью наблюдать, что повышенная сократительная способность, наблюдаемая на фиг. 1, была достигнута без изменения переходных процессов  $Ca^{2+}$ : на фиг. 2 показано, что никакого существенного изменения амплитуды переходных процессов  $Ca^{2+}$  не наблюдалось ни при каких тестируемых концентрациях АС01/НМ01. Тем не менее, как видно на фиг. 1, АС01/НМ01 увеличивали фракционное укорочение (сократительную способность). Это позволяет предположить, что сократительный эффект связан с повышенной чувствительностью к  $Ca^{2+}$ , а не с увеличением высвобождения  $Ca^{2+}$ . На фиг. 3 показано, что АС01/НМ01 не увеличивает переходные процессы  $Ca^{2+}$  в кардиомиоцитах пустышек. В кардиомиоцитах мышечей-пустышек С01/НМ01 с предварительной обработкой D-Lys3 или без нее не оказывает никакого влияния на амплитуды переходных процессов  $Ca^{2+}$  по сравнению с клетками, обработанными носителем (фиг. 3). Это еще раз подтверждает, что сократительный эффект АС01/НМ01 обусловлен усиленным механизмом сенсibilизации к  $Ca^{2+}$ , как показано на фиг. 2.

АС01/НМ01 снижают фосфорилирование cTnI, что связано с повышенной чувствительностью к  $Ca^{2+}$  (фиг. 4)

Ранее было показано, что изменения в фосфорилировании сериновых остатков 22-23 белка сердечного саркомера cTnI влияют на чувствительность миофиламента к  $Ca^{2+}$  в миоцитах кожи мышечей и крыс через механизм, зависящий от цАМФ-ПКА (сАМР-РКА). Чтобы исследовать молекулярный механизм,

лежащий в основе повышенной чувствительности к  $\text{Ca}^{2+}$  и сократительной способности в экспериментальной модели по настоящему изобретению, суспензию кардиомиоцитов мышей-пустышек обрабатывали носителем или AC01/HM01 с D-Lys 3 или без него, затем обрабатывали для биохимического анализа. На фиг. 4 показано, что в анализах вестерн-блоттинга белковых экстрактов кардиомиоциты, обработанные AC01/HM01, демонстрировали сниженные уровни фосфорилирования (средняя колонка; серая полоса) cTnI (серин 22-23) по сравнению с кардиомиоцитами, обработанными носителем (левая колонка, белая полоса), в то время как предварительная обработка D-Lys3 блокировала этот эффект (правая колонка, красная полоска).

Эти данные согласуются с моделью, согласно которой AC01/HM01 активирует рецептор грелина и повышает чувствительность к  $\text{Ca}^{2+}$  за счет снижения фосфорилирования cTnI.

AC01/HM01 снижает активность ПКА кардиомиоцитов и фосфорилирование cTnI (фиг. 5)

Фосфорилирование cTnI (Ser 22-23) опосредуется ПКА. Следовательно, были проведены исследования влияния AC01/HM01 на ферментативную активность ПКА. На фиг. 5 показано, что активность ПКА снизилась в кардиомиоцитах, обработанных AC01/HM01 по сравнению с носителем, и что этот эффект был заблокирован предварительной обработкой D-Lys 3 перед стимуляцией AC01/HM01. Это неожиданно позволяет предположить, что агонист рецептора грелина AC01/HM01 может активировать передачу сигналов, ингибирующих  $G\alpha$  ( $G\alpha_i$ ), которая ингибирует активность аденилатциклазы, приводя к снижению активности ПКА.

#### Комментарии

Данные показали, что AC01/HM01, но не носитель, увеличивает сократительную способность кардиомиоцитов дозозависимым образом. Неожиданно в отличие от существующих инотропов, AC01/HM01 увеличивает сократительную способность без увеличения переходных амплитуд  $\text{Ca}^{2+}$  в кардиомиоцитах, что позволяет предположить, что увеличение сократительной способности происходило за счет повышения чувствительности миофиламентов к  $\text{Ca}^{2+}$ . Специфический антагонист грелина, D-Lys 3 GHRP-6, блокировал влияние AC01/HM01 на сократимость кардиомиоцитов, что дополнительно подтверждает, что сократительный эффект контролируется передачей сигналов рецептора грелина. Индуцированное AC01/HM01 увеличение чувствительности миофиламентов к  $\text{Ca}^{2+}$ , по-видимому, связано с ингибирующей передачей сигналов рецептора грелина  $G-\alpha$  ( $G-\alpha_i$ ), что приводит к снижению активности ПКА и снижению фосфорилирования cTnI Ser 22-23. Это предполагает новый фармакологический способ воздействия на функцию миофиламентов с целью повышения сократительной способности.

Эти результаты подчеркивают потенциальное использование этой новой первой в своем классе молекулы и нового механизма действия для лечения сердечной недостаточности, увеличения сократимости и сердечного выброса без механизмов традиционных инотропов, которые увеличивают концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  и вызывают повышенную потребность в кислороде, тахикардию, аритмию, ишемию и повышенную смертность.

Центральное место в регуляции гемодинамики занимает вегетативная нервная система, которая контролирует высвобождение катехоламинов (адреналина и норадреналина) из симпатических нервных окончаний и надпочечников. Важной функцией этого является регуляция инотропного состояния сердца. Активация  $\beta$ -адренергических рецепторов в сердце приводит к стимуляции передачи сигналов цАМФ-ПКА, что приводит к увеличению сердечного выброса за счет увеличения частоты сердечных сокращений (хронотропия), увеличения силы сокращения (инотропия) и увеличения скорости расслабления (лузитропия). Увеличение силы сокращения сердца за счет активации цАМФ-ПКА зависит от усиления передачи сигналов  $\text{Ca}^{2+}$  в миоцитах. Альтернативным механизмом повышения сократительной способности, который не требует токсического усиления высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$ , является сенсibilизация миофиламентов к  $\text{Ca}^{2+}$ . Действительно, существует физиологический механизм регуляции чувствительности к  $\text{Ca}^{2+}$  посредством ПКА-зависимого фосфорилирования cTnI по остаткам серина 22 и 23 (Ser22/23 у мыши и Ser23/24 у человека) на N-конце, который регулирует афинность cTnC к связыванию  $\text{Ca}^{2+}$ . Когда cTnI фосфорилируется, чувствительность миофиламента к  $\text{Ca}^{2+}$  снижается, и кривая зависимости силы- $\text{Ca}^{2+}$  смещается вправо (меньшее усилие при данной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ ). Доказательства обратной корреляции между фосфорилированием cTnI (Ser 22-23) и чувствительностью миофиламентов к  $\text{Ca}^{2+}$  обнаружены в сердцах с терминальной стадией недостаточности, которые демонстрировали сниженное фосфорилирование cTnI и повышенную чувствительность к  $\text{Ca}^{2+}$  по сравнению с донорскими сердцами, в то время как лечение ПКА устраняло любую разницу в чувствительности к  $\text{Ca}^{2+}$  между поврежденными и неповрежденными миоцитами. Это предполагает, что при сердечной недостаточности активируются компенсаторные механизмы для улучшения сократительной способности за счет повышения чувствительности к  $\text{Ca}^{2+}$ . Неожиданно, AC01/HM01, по-видимому, усиливает эти механизмы чувствительности к  $\text{Ca}^{2+}$ .

Таким образом, данные по настоящей патентной заявке демонстрируют, что новая молекула AC01/HM01 является первым в своем классе новым типом миотропа, который специфически воздействует на рецептор грелина и увеличивает сократительную способность кардиомиоцитов. В противоположность обычным инотропам, которые действуют путем вредного увеличения переходных процессов  $\text{Ca}^{2+}$ , AC01/HM01 вместо этого снижает активность ПКА и уменьшает фосфорилирование cTnI, возможно,

посредством передачи сигналов рецепторами, опосредованными G $\alpha$ i, и, таким образом, повышает чувствительность к Ca<sup>2+</sup> (фиг. 6). Это первое сообщение, показывающее повышенную сократительную способность AC01/HM01 в кардиомиоцитах. Это исследование поддерживает использование AC01/HM01 в качестве средства для лечения сниженной сократительной способности сердца при СН.

#### Пример 2

У человека, однократная возрастающая доза, фаза 1, рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование для оценки безопасности и фармакокинетики перорального применения HM01 у здоровых добровольцев мужского пола

#### Первичные цели

Установить максимально переносимую дозу (МПД) (MTD) путем оценки безопасности и переносимости исследуемых однократных доз HM01 для приема внутрь по возрастающей, вплоть до максимальной дозы 10 мг.

Оценить фармакокинетику (ФК) (PK) HM01 и его метаболитов (M2, M6 и M9) после однократного приема внутрь

#### Вторичные цели

Для оценки биомаркеров фармакодинамики (ФД) (PD).

Для оценки функциональных параметров, связанных с механизмом действия HM01.

#### План исследования

Одноцентровое, рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование однократных нарастающих доз (SAD) (ОНД).

Скрининговые обследования проводились в течение 28 дней до приема препарата. Подходящие субъекты возвращались в исследовательский центр утром 1-го дня и оставались в стационаре до выписки через 72 часа после приема препарата (утром 4-го дня), если не возникало проблем с безопасностью. Пероральную дозу вводили утром 1-го дня. Пациенты возвращались в клинику через 7 дней после лечения, утром 8-го дня ( $\pm 1$  день) для оценки безопасности.

После завершения всех 72-часовых оценок когорты были проанализированы слепые данные о безопасности и псевдонимизированные данные ФК, и комитет по повышению дозы (DEC) (dose escalation committee (DEC)) принял решение о следующем увеличении дозы.

В зависимости от характера, частоты и тяжести профиля безопасности, DEC, включая, при необходимости, экспертов в соответствующей области, принимала решение о том, следует ли:

Продолжать повышение дозы в соответствии с запланированной схемой;

Прекратить повышение дозы (то есть, отказаться от дальнейшего приема исследуемого препарата);

Продолжать прием с дальнейшим повышением дозы до запланированных доз, то есть, доз  $>5$  мг (но  $<10$  мг).

#### Участвующие субъекты

Здоровые некурящие субъекты мужского пола в возрасте от 18 до 50 лет включительно, с индексом массы тела (ИМТ) от 18,5 до 29,9 кг/м<sup>2</sup> включительно. Были запланированы когорты по 8 человек на каждый этап дозирования. Когорта 1 (10 мг или плацебо) была прекращена после приема препарата 4 субъектами. Когорты 2-4 состояли из 8 субъектов в каждой, то есть, в общей сложности 28 субъектов, которые были рандомизированы и завершили исследование. Случаев отмены препарата не было.

#### Тестируемый продукт, доза и способ применения

Порошок HM01 HCl в желатиновых капсулах. Были доступны капсулы с концентрацией 0,1 мг, 1,0 мг и 10 мг для когорты 1.

Когорта 1: 10 мг HM01

Когорта 2: 0,1 мг HM01, когорта 3: 0,3 мг HM01, когорта 4: 1,0 мг HM01

Первая когорта состояла из 4 субъектов (3 активных, 1 плацебо).

Когорты со 2-й по 4-ю состояли из 8 субъектов, 6 субъектов получали дозу HM01 и 2 субъекта получали плацебо. По соображениям безопасности каждая когорта была разделена на 2 подгруппы: первая подгруппа из 2 субъектов (1 HM01, 1 плацебо) и вторая подгруппа из 6 субъектов (5 HM01, 1 плацебо). Вторая подгруппа была начата только при отсутствии каких-либо серьезных проблем с безопасностью по оценке исследователя по истечении по меньшей мере 24 часов.

Субъектам вводили дозу натощак (без приема пищи в течение по меньшей мере 8 часов). Доступ к пище был ограничен до 4 часов после введения дозы. Капсулы вводили перорально вместе с 240 мл воды.

#### Переменные безопасности

Нежелательные явления (НЯ) (AE), показатели жизнедеятельности (артериальное давление, частота пульса и температура тела), ЭКГ в 12 отведениях, холтеровская ЭКГ, медицинский осмотр (МО) (PE) и лабораторные анализы (гематология, клиническая химия и анализ мочи) оценивались во время скрининга и несколько раз на протяжении всего исследования.

#### Фармакокинетические переменные

Образцы крови для аналитического анализа на HM01 и 3 основных метаболита (M2, M6 и M9) от-

бирали перед введением дозы (в течение 60 минут до введения препарата) и в 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 24, через 30, 36, 48, 60 и 72 часа после введения дозы (18 образцов). Мочу собирали в течение 24 часов после введения дозы. Образцы крови и мочи анализировали на содержание НМ01 и его метаболитов с использованием валидированных методов ЖХ-МС/МС (жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS methods)).

Оцениваемые параметры ФК включали  $C_{max}$  (максимальная наблюдаемая концентрация),  $C_{max}/D$  ( $C_{max}$  на единицу дозы),  $t_{max}$  (время пика),  $C_{last}$  (последняя измеряемая концентрация выше нижнего предела количественной оценки),  $t_{last}$  (время  $C_{last}$ ),  $AUC_{(0-24)}$  и  $AUC_{last}$  (площадь под кривой зависимости концентрации от времени в плазме от нуля до 24 часов и до последней измеряемой концентрации,  $t_{last}$ , соответственно),  $AUC_{last}/D$  ( $AUC_{last}$  на единицу дозы),  $AUC_{\infty}$ , (площадь под кривой зависимости концентрации от времени в плазме от нуля до бесконечности),  $AUC_{\infty}/D$  ( $AUC_{\infty}$ , на единицу дозы),  $t_{1/2}$  (кажущийся конечный период полураспада),  $CL/F$  (системный клиренс после внесосудистого введения, только для исходного лекарственного средства),  $Vz/F$  (кажущийся объем распределения после внесосудистого введения, только для исходного лекарственного средства),  $MPT$  (среднее время нахождения).

Дополнительные параметры были получены из мочи, то есть,  $Ae_{(0-24)}$ , количество исходного лекарственного средства и метаболитов, выделенных за 24 ч, и  $CL_R$ , почечный клиренс.

Фармакодинамические переменные

Образцы крови для определения гормона роста (ГР) (GH), инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1) (IGF-1), адренокортикотропного гормона (АКТГ) (ACTH), пролактина, кортизола и альдостерона в сыворотке крови до введения дозы и 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 и через 24 часа после введения дозы были взяты путем венозной пункции. Все биомаркеры были определены с использованием иммуноферментного анализа (ELISA). Упрощенный опросник пищевого аппетита, основанный на оценке аппетита на 1-й день после ужина и на 1-й день перед приемом дозы, через 1, 2, 4, 8 и 24 часа после приема. Дневник стула, начиная с 1-го дня и заканчивая выпиской на 4-й день.

Результаты

Фармакокинетика

Для НМ01 и М6 наблюдалось пропорциональное дозе увеличение  $AUC_{\infty}$  и  $C_{max}$ . Для  $AUC_{last}$  для НМ01 и М6 наблюдалось несколько большее, чем пропорциональное дозе увеличение  $AUC_{last}$  для НМ01 и М6 с наклонами функции 1,29 и 1,26, соответственно, и 90% доверительными интервалами выше 1. Среднее арифметическое время полувыведения (от 9 до 11 часов), медиана  $t_{max}$  (от 3 до 4 часов), средний геометрический клиренс (от 55,9 до 65,8 л/ч) и объем распределения (от 801 до 911 л) НМ01 были одинаковыми для всех доз. После введения от 0,1 мг до 10 мг НМ01 средний арифметический период полувыведения М6 составлял от 23 до 37 часов, а медиана  $t_{max}$  - от 3,0 до 5,0 часов. Соотношение  $AUC_{\infty}$  М6 к НМ01 было подобным после введения 0,3 и 1,0 мг НМ01 (2,330, 2,336) и несколько ниже для дозы 10 мг (1,761). Около 10% от дозы в 10 мг выводилось с мочой в виде исходного соединения НМ01 и 16% в виде М6.

Таблица

Краткое описание основных параметров ФК НМ01 (данные ФК)				
	0,1 мг НМ01 N=6	0,3 мг НМ01 N=6	1 мг НМ01 N=6	10 мг НМ01 N=3
$AUC_{(0-24)}$ (ч*нг/мл)	-	3,747 (14,4)	13,42 (40,4)	148,8 (32,3)
$AUC_{last}$ (ч*нг/мл)	0,4899 (98,7)	2,819 (39,8)	14,71 (53,4)	176,1 (37,7)
$AUC_{last}/D$ (ч*нг/мл) мг	4,899 (98,7)	9,396 (39,8)	14,71 (53,4)	17,61 (37,7)
$AUC_{\infty}$ (ч*нг/мл)	-	4,558 (24,6) <sup>a</sup>	16,94 (48,6)	178,8 (37,1)
$AUC_{\infty}$ (ч*нг/мл) мг	-	15,19 (24,6) <sup>a</sup>	16,94 (48,6)	17,88 (37,1)
$C_{max}$ (нг/мл)	0,1357 (20,9)	0,2866 (26,7)	1,280 (34,7)	15,28 (47,1)
$C_{max}/D$ (нг/мл)мг	1,357 (20,9)	0,9554 (26,7)	1,280 (34,7)	1,528 (47,1)
$t_{max}$ (ч)	3,00 (2,0-3,0)	4,00 (3,0-6,0)	4,00 (3,0-6,0)	3,00 (2,0-3,0)
$t_{last}$ (ч)	8,00 (4,0-8,0)	16,00(12,0-24,0)	36,00(16,0-36,0)	72,00(48,0-72,0)
$\lambda_z$ (ч <sup>-1</sup> )	-	0,0821 (33,2) <sup>a</sup>	0,0648 (27,7)	0,0646 (19,8)
$t_{1/2}$ (ч)	-	8,830 (36,4) <sup>a</sup>	11,00 (23,7)	10,86 (18,6)
$CL/F$ (ч)	-	65,8 (24,6) <sup>a</sup>	59,0 (48,6)	55,9 (37,1)
$V_z/F$ (л)	-	801,2 (12,5) <sup>a</sup>	911,3 (28,1)	865,6 (16,5)
$MPT$ (ч)	-	14,45 (24,3) <sup>a</sup>	15,33 (21,2)	14,19 (11,4)
Представлены среднее геометрическое и геометрический CV (%), за исключением $t_{1/2}$ , где указаны арифметическое и арифметический CV (%), и для $t_{max}$ , где указаны медианы и диапазоны; <sup>a</sup> = 5 (из-за ненадежного определения конечной фазы у одного испытуемого)				

### Фармакодинамика

Концентрации ГР увеличивались по сравнению с исходным уровнем после введения НМ01 с пиковыми концентрациями через 2-3 часа после приема дозы. Увеличение ГР было более значительным после введения 1,0 и 10 мг НМ01, тогда как более низкие увеличения наблюдались после 0,3 и 0,1 мг НМ01. Средние кривые ГР были одинаковыми после приема 1,0 и 10 мг НМ01. После достижения пика концентрация ГР быстро снижалась. Значимых различий в уровнях ИФР-1 в сыворотке крови между группами, принимавшими дозы, и плацебо не наблюдалось. Концентрации АКТГ, пролактина, кортизола и альдостерона быстро повышались по сравнению с исходными значениями после введения более высоких доз 1,0 и 10 мг НМ01. Пиковые концентрации, как правило, наблюдались через 2-3 часа после приема. После этого концентрации быстро снижались. Увеличение было сходным после 1,0 и 10 мг НМ01, за исключением пролактина, где увеличение было выше после 10 мг по сравнению с 1,0 мг, и АКТГ, уровни которого определялись только после дозы 1,0 мг НМ01. Опросник аппетита не выявил существенных или последовательных различий между группами, принимавшими дозы, и плацебо. Между группами, получавшими дозу, не было различий в количестве дефекаций в день и количестве испытуемых с дефекацией, зависящих от дозы.

### Безопасность

Количество субъектов, сообщивших о побочных эффектах, возникающих при лечении (НЯВЛ) (TEAE), и количество НЯВЛ увеличивалось в зависимости от дозы: после приема 0,1 мг НМ01 о НЯВЛ не сообщалось, 2 субъекта (33,3%) сообщили о 5 НЯВЛ после приема 0,3 мг, 3 субъекта (50,0%) сообщили о 7 НЯВЛ после приема 1,0 мг, и 3 субъекта (100%) сообщили о 19 НЯВЛ после приема 10 мг НМ01 по сравнению с 5 субъектами (71,4%), сообщившими о 5 НЯВЛ после приема плацебо.

Наиболее часто сообщалось о НЯВЛ со стороны нервной системы (главным образом, головная боль) и сердечной деятельности (главным образом, синусовая брадикардия), которые начинались в основном вскоре после приема препарата и были кратковременными. Большинство НЯВЛ были легкой интенсивности, о НЯВЛ умеренной интенсивности сообщалось у 1 субъекта после введения 1,0 мг (приливы) и 10 мг АС01 (синусовая брадикардия) и плацебо (головная боль). Клинически значимых различий между группами дозирования по каким-либо лабораторным показателям выявлено не было. Среднее систолическое и диастолическое артериальное давление и температура тела не показали клинически значимых изменений после приема препарата или различий между группами лечения.

### Пример 3

Рандомизированное, двойное слепое, многократно увеличивающее дозу, плацебо-контролируемое, многоцентровое исследование безопасности, переносимости, эффективности, фармакокинетики (ФКК) и фармакодинамики (ФД) фазы 1b/2a с пероральным агонистом грелина АС01 у пациентов с сердечной недостаточностью со сниженной фракцией выброса (СНнФВ)

Исследование сосредоточено на пациентах с СНнФВ, имеющих сниженную сократительную способность сердца, низкий сердечный выброс и неадаптивную нейрогормональную активацию для поддержания сердечного выброса, тяжелые симптомы и высокие показатели госпитализации по поводу обострения сердечной недостаточности и смерти, а также упомянутые выше доклинические данные, свидетельствующие о том, что АС01 увеличивает сократительную способность кардиомиоцитов за счет сенсibilизации к кальцию, а не увеличения концентрации кальция и, таким образом, может улучшить сократительную способность сердца, сердечный выброс и клинические исходы без побочных эффектов обычных инотропов.

### План исследования

Многоцентровое, рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование, проведенное в 2 частях: последовательная фаза увеличения дозы в когорте (часть А) и последующая параллельная фаза расширения когорты (часть Б). Пациентов рандомизировали в соотношении 3:1 для получения мини-таблеток АС01 или мини-таблеток плацебо натошак в течение 7 дней дважды в сутки (фаза увеличения дозы, часть А) или 28 дней (фаза расширения когорты, часть Б).

### Фаза увеличения дозы (Часть А)

До 40-56 пациентов поровну делили на 7 когорт. 6 Активных и 2 плацебо пациента на когорту. Восемь пациентов в каждой из 5 первоначальных когорт с последовательным введением дозы получают лечение несколькими возрастающими дозами АС01 (повышая с 0,1 мг дважды в сутки до 5 мг последовательных уровней дозы) или плацебо дважды в сутки в течение 7 дней. При необходимости могут быть добавлены до 2 дополнительных когорт. Увеличение дозы не превысит 3,3 раза от уровня дозы в предыдущей когорте и будет не менее чем на 25% выше уровня дозы в предыдущей когорте. Увеличение дозы прекращается при достижении общей суточной дозы 5 мг дважды в сутки. Пациенты будут иметь ИКД (ICD) (для защиты от желудочковой аритмии и тяжелой брадикардии). Выбирают два уровня дозы, по 1 для каждой группы на последующем этапе расширения когорты (Часть Б). Однако, основываясь на результатах фазы увеличения дозы (Часть А), могут быть определены дополнительные уровни дозы для фазы расширения когорты (Часть Б). Период оценки дозы будет составлять от первого введения АС01 до 12-го дня (5 дней после последнего введения исследуемого лекарственного препарата [ИЛП (IMP (investigational medicinal product))] в каждой когорте). Между 12-м днем после последнего введения ИЛП в 1

когорте и первой дозой в следующей когорте пройдет минимум 10 дней, чтобы обеспечить достаточное время для рассмотрения данных Комитетом по проверке безопасности (Safety Review Committee) (SRC).

#### Фаза расширения когорты (Часть Б)

По завершении Части А от 40 до 60 пациентов, различных индивидуумов, принимавших участие в Части А, включают в Часть Б (расширение когорты). Эти пациенты будут разделены на 2 когорты по дозам и будут получать лечение два раза в день в течение 28 дней с уровнями доз, указанными в Части А. Если для расширения когорты выбрано более 2 уровней доз, общее количество пациентов на когорту и/или общее количество когорт будет пересмотрено, чтобы охватить все возможные уровни доз.

#### Исследуемый препарат

АС01 производится в виде мини-таблеток по 0,05 мг и 1 мг. Плацебо также находится в виде мини-таблеток, имеющих тот же внешний вид, форму, запах и вкус, что и таблетки АС01.

#### Цели

##### Фаза увеличения дозы (Часть А)

Первичная цель: установить безопасность и переносимость многократных возрастающих доз перорального АС01 у амбулаторных пациентов со стабильной СНФВ, получающих лечение дважды в день в течение 7 дней, и оценить рекомендуемые дозы (РД) (RD) для фазы расширения когорты (Часть Б).

Вторичные цели: определить ФК АС01; определить ФД АС01 и соотношение ФК/ФД.

Исследовательская цель: определить влияние АС01 на клинические переменные (прямые эффекты, например, циркулирующий ГР; ударный объем [SV] (УО) и СВ (сердечный выброс (CO- cardiac output)), связанные с его механизмом действия и целевым взаимодействием и имеющие отношение к клиническим результатам у пациентов со стабильной СНФВ.

##### Фаза расширения когорты (часть Б)

Первичная цель: Расширить оценку безопасности и переносимости и провести предварительную оценку эффективности у пациентов со стабильной СНФВ, получавших лечение дважды в сутки в течение 28 дней при двух уровнях дозы АС01, начиная с фазы увеличения дозы (часть А). Поисковые показатели эффективности АС01 включают без ограничения первичные прямые (циркулирующий ГР), а также вторичные прямые и непрямые эффекты, модифицирующие гемодинамику и заболевание (например, УО, СВ и другие функциональные параметры, такие как эхокардиографические показатели и ((NT-проМНП) (NT-proBNP)).

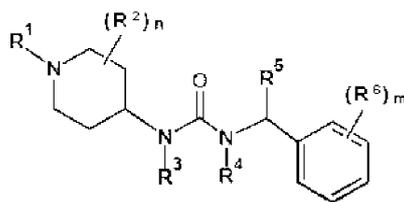
Вторичные цели: сформировать дополнительные данные по ФК АС01; сформировать дополнительные данные по ФД АС01 и соотношениях ФК/ФД.

Оцениваются следующие результаты безопасности (Части А и Б): Первичные результаты: частота сердечных сокращений, систолическое артериальное давление, среднее артериальное давление, медицинский осмотр (обследование легких, обследование сердца, осмотр конечностей (отек)), обследование на аритмию (холтеровская электрокардиограмма [ЭКГ], ЭКГ в 12 отведениях, отчеты об имплантированном кардиовертередефибриляторе [ИКД], непрерывная телеметрия), бради- или тахикардия (холтеровское ЭКГ, ЭКГ в 12 отведениях, отчеты ИКД, непрерывная телеметрия [только Часть А]), ишемия (симптомы, изменения ЭКГ и/или высокочувствительный тест на сердечный тропонин (hs-Troponin T/I), интервалы ЭКГ, то есть, частота сердечных сокращений, PR, QRS и QTcF, NT-проМНП в плазме, рСКФ (eGFR) (калий; натрий), гематология (гемоглобин, лейкоциты с дифференцировкой, тромбоциты), ферменты печени, нежелательные явления (НЯ), вес, глюкоза в плазме.

Вторичные результаты: показатели ФК: для каждой когорты оценивают ФК-параметры АС01 и потенциально активного метаболита М6 для оценки скорости и степени абсорбции, распределения и выведения, а также для обоснования интерпретации результатов безопасности и эффективности. Показатели ФД: ФД оценивается с помощью измерений безопасности, указанных выше, и измерений поисковых показателей эффективности с использованием биомаркеров, неинвазивного СВ, эхокардиографии в определенные моменты времени, указанные в Расписании мероприятий.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

## 1. Применение соединения формулы (I)



(I)

или его фармацевтически приемлемой соли,

где в формуле (I):

R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>5</sup> независимо друг от друга представляют собой C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил,

R<sup>1</sup>, R<sup>4</sup> независимо друг от друга представляют собой водород или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил,

R<sup>6</sup> представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил, гало, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкокси или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-галоалкил,

n представляет собой 2-3,

m представляет собой 1-3,

в производстве лекарственного средства с инотропной активностью.

2. Применение по п.1, где указанное лекарственное средство свободно от побочных эффектов, вызванных повышенной концентрацией кальция.

3. Применение по пп.1, 2, где R<sup>4</sup> представляет собой водород.

4. Применение по п.3, где n представляет собой 2.

5. Применение по п.4, где R<sup>2</sup> представляет собой метил.

6. Применение по п.5, где две R<sup>2</sup> группы присоединены к одному и тому же углеродному кольцу пиперидинового кольца формулы (I), предпочтительно в 3-ил положении.

7. Применение по пп.1-6, где соблюдено одно или более из следующих условий:

оба R<sup>3</sup> и R<sup>5</sup> представляют собой C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкил, предпочтительно метил,

m представляет собой 3,

R<sup>6</sup> представляет собой гало и/или алкокси, предпочтительно по меньшей мере один R<sup>6</sup> представляет собой алкокси.

8. Применение по пп.1-7, где указанное соединение формулы (I) представляет собой 1-[(1S)-1-(2,3-дихлор-4-метоксифенил)этил]-3-метил-3-[(4R)-1-метил-3,3-диметил-4-пиперидил]-мочевину.

9. Применение по пп.1-8, где указанная фармацевтически приемлемая соль представляет собой моногидрохлоридную соль.

10. Применение по пп.1-9 для лечения состояний, связанных со сниженной и/или неэффективной сократительной способностью сердца у пациента, нуждающегося в этом.

11. Применение по пп.1-10 для лечения состояний, выбранных из сердечной недостаточности, сердечного приступа, кардиогенного шока, септического шока, инфаркта миокарда, кардиомиопатии, гипертонии легочной артерии (ЛАГ).

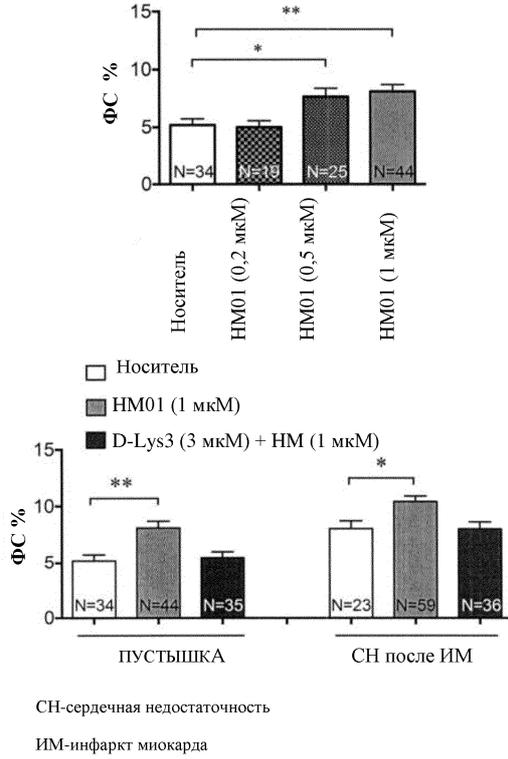
12. Применение по п.11, где указанная кардиомиопатия представляет собой дилатационную кардиомиопатию (ДКМП), в частности, семейную дкмп.

13. Применение по пп.1-11 для лечения тяжелой, прогрессирующей, хронической или острой сердечной недостаточности.

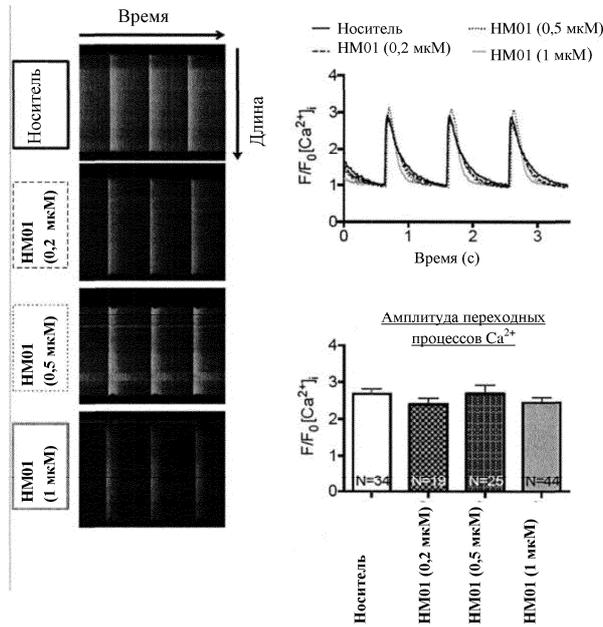
14. Применение по пп.1-11 для лечения тяжелой, прогрессирующей, хронической или острой сердечной недостаточности со сниженной фракцией сердечного выброса.

15. Применение по пп.2-14, где указанные побочные эффекты, обусловленные повышенными концентрациями кальция, выбраны из повышенной потребности миокарда в кислороде, ишемии, аритмии и гипотензии.

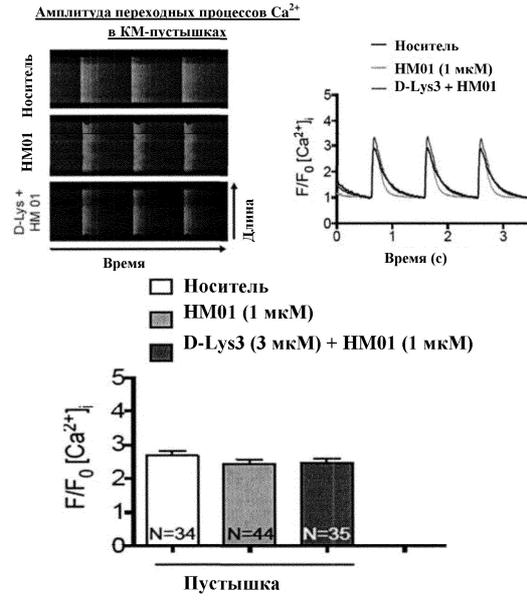
**Дозозависимый эффект НМ01**



Фиг. 1

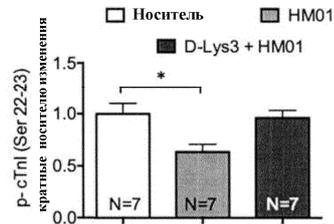
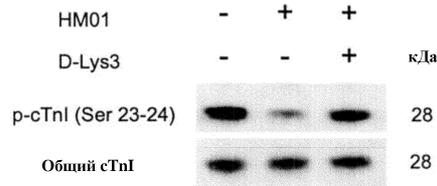


Фиг. 2

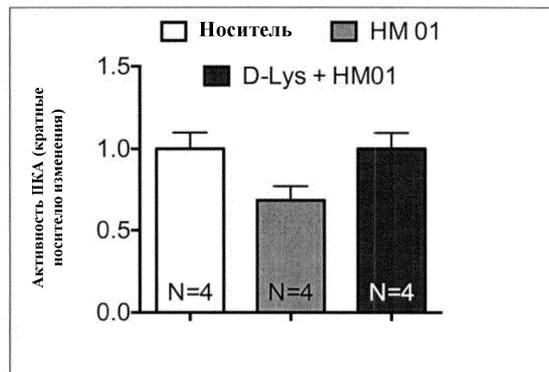


КМ-кардиоциты

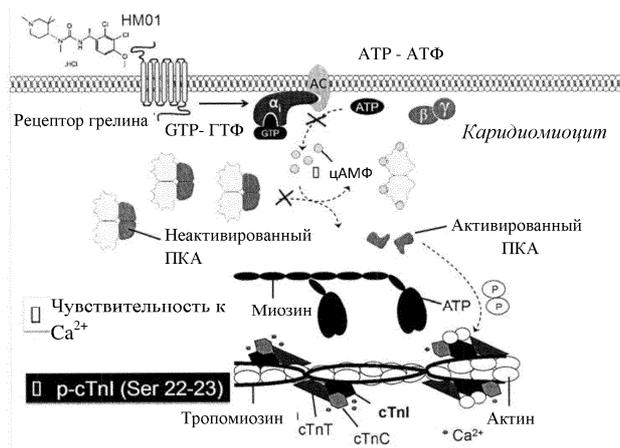
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6