



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0044759

(51)^{2020.01} C07K 14/475; A61K 38/18; A61P 9/00 (13) B

(21) 1-2021-06913

(22) 31/03/2020

(86) PCT/US2020/025921 31/03/2020

(87) WO2020/205840 08/10/2020

(30) 62/827,386 01/04/2019 US

(45) 25/04/2025 445

(43) 25/01/2022 406A

(71) ELI LILLY AND COMPANY (US)

Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America

(72) DAY, Jonathan Wesley (US); HEUER, Josef George (US); MUPPIDI, Avinash (IN);
NI, Wei (CN); PANCOOK, James David (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) HỢP CHẤT NEUREGULIN-4, DƯỢC PHẨM VÀ DỤNG CỤ BƠM CHỨA HỢP
CHẤT NÀY

(21) 1-2021-06913

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất neuregulin (NRG) 4, dược phẩm và dụng cụ bơm chứa hợp chất này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các hợp chất neuregulin (NRG) 4 và các phương pháp điều trị bằng các hợp chất NRG4. Các hợp chất NRG4 theo sáng chế tốt hơn là có sự liên kết hữu hiệu với thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (HER) 4 của người, và hoạt tính hữu hiệu liên quan đến sự liên kết đó. Các hợp chất NRG4 được ưu tiên có thể là hữu ích để cải thiện chức năng tim và/hoặc điều trị các bệnh trong đó sự liên kết HER4 và hoạt tính thu được đóng một vai trò đáng chú ý, như chứng suy tim (heart failure-HF), bao gồm HF có giảm phân suất tổng máu (HFrEF).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Có nhu cầu y tế chưa được đáp ứng về các phương pháp điều trị mới và cải tiến cho HF. Các liệu pháp hiện có nhằm làm chậm sự tiến triển của bệnh và cải thiện các triệu chứng, đồng thời dựa vào những thay đổi huyết động học để làm giảm khối lượng công việc của tim bị suy. Các liệu pháp này bao gồm các tác nhân nhằm: (a) giảm nhịp tim, chẳng hạn như thuốc chẹn beta và ivabradine; (b) giảm huyết áp, chẳng hạn như thuốc ức chế enzym chuyển hóa angiotensin (ACE), thuốc chẹn thụ thể angiotensin II (ARB), thuốc đối kháng thụ thể mineralocorticoid (MRA), và sacubitril/valsartan (ENTRESTO®); và/hoặc (c) điều trị hoặc ngăn ngừa quá tải thể tích, chẳng hạn như thuốc lợi tiểu và MRA. Tuy nhiên, những phương pháp điều trị này không trực tiếp điều trị tim và có những hạn chế thực tế, chẳng hạn như yêu cầu chuẩn độ liều và theo dõi hạ huyết áp. Ngoài ra, ngay cả khi có những lựa chọn điều trị hiện có này, tất cả bệnh nhân HF, ngay cả những người có triệu chứng nhẹ đều có nguy cơ tử vong cao. Ví dụ, xem 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. Do đó, các phương pháp điều trị HF mới và cải tiến là cần thiết.

Các nỗ lực nghiên cứu và phát triển để xác định các lựa chọn điều trị mới đã được thực hiện. Ví dụ, WO2014/187342 mô tả việc ngăn ngừa, điều trị hoặc trì hoãn HF thông qua việc giải phóng kéo dài NRG, được chỉ ra là bao gồm NRG1, NRG2, NRG3 và NRG4. Công bố này cũng mô tả nghiên cứu lâm sàng được tiến hành với mục đích sử dụng kéo dài NRG-1 ở bệnh nhân suy tim mãn tính.

Tuy nhiên, nhu cầu vẫn còn đối với các lựa chọn điều trị với hiệu quả được cải thiện và giảm nguy cơ độc tính so với các liệu pháp hiện có. Cần có các liệu pháp cải thiện kết quả lâu dài, bao gồm tăng tỷ lệ sống sót và giảm tỷ lệ nhập viện. Cũng cần có các liệu pháp cải thiện chức năng tim, với khả năng thay đổi hoặc đảo ngược bệnh, thông qua các cơ chế khác ngoài thay đổi huyết động lực. Cũng cần có các liệu pháp dung nạp tốt hơn, đặc biệt là điều trị ở những bệnh nhân có bệnh kèm theo như hạ huyết áp, hạ kali máu và rối loạn chức năng thận. Cũng cần có các liệu pháp cải thiện chất lượng cuộc sống (QOL) ở những bệnh nhân mắc bệnh giai đoạn nặng. Sáng chế nhằm đáp ứng một hoặc nhiều nhu cầu quan trọng chưa được đáp ứng này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, sáng chế đề xuất các hợp chất NRG4 có hoạt tính liên quan đến sự liên kết chọn lọc với HER4. Các hợp chất NRG4 theo sáng chế có ít đến không có sự liên kết với HER3, dẫn đến giảm nguy cơ độc tính và/hoặc các vấn đề về khả năng dung nạp liên quan đến HER3.

Sáng chế cũng mô tả các phương pháp sử dụng các hợp chất NRG4 để điều trị hoặc ngăn ngừa CVD và các tình trạng liên quan, bao gồm cụ thể là HF. Các hợp chất NRG4 được ưu tiên và các phương pháp theo sáng chế làm giảm nguy cơ tử vong liên quan đến CV hoặc nhập viện liên quan đến HF, giảm nguy cơ nhồi máu cơ tim (MI) hoặc đột quỵ, giảm xác suất cần đến thiết bị hỗ trợ thất trái (LVAD) hoặc cấy ghép tim, cải thiện chức năng và cấu trúc tim, và/hoặc cải thiện các triệu chứng và hạn chế thể chất liên quan đến HF, dẫn đến cải thiện QoL. Các hợp chất và phương pháp NRG4 được ưu tiên có thể được sử dụng kết hợp với tiêu chuẩn chăm sóc (SoC) mà không cần chuẩn độ hoặc theo dõi, và không làm tăng hạ huyết áp, làm xấu chức năng thận, dẫn đến mất cân bằng điện giải, góp phần vào rối loạn chức năng gan, tăng tỷ lệ mắc các khối u, và/hoặc dẫn đến tình trạng giảm thể tích huyết kéo dài.

Sáng chế cũng đề xuất hợp chất NRG4 bao gồm sự cải biến gốc D ở vị trí 1 thành gốc G và lên đến năm cải biến bổ sung so với trình tự axit amin của NRG4 người (SEQ ID NO:1).

Sáng chế cũng đề xuất các hợp chất NRG4 có công thức:

$X_0\text{GHEEPCGX}_8\text{SHKSFLNGGLCYX}_{22}\text{IPTX}_{26}\text{PSPFCRCVX}_{35}\text{NYTGARCEX}_{44}\text{VFL}$;

trong đó: X_0 được chọn từ nhóm bao gồm T, PT, MPT, S, GS, GGS, GGGS và

(GGGGX λ) $_n$ trong đó X λ là Q, A, E hoặc S và $n=1-5$ (SEQ ID NO:5), hoặc không có mặt; X $_8$ là E hoặc P; X $_{22}$ là Q hoặc V; X $_{26}$ là F hoặc I; X $_{35}$ là E hoặc A; và X $_{44}$ là H, K hoặc E (SEQ ID NO:2).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa HFrEF ở bệnh nhân cần được điều trị, bao gồm việc sử dụng cho bệnh nhân lượng có hiệu quả điều trị của hợp chất NRG4 trong 24-96 giờ.

Một phương án khác của sáng chế đề xuất hợp chất NRG4 theo sáng chế để sử dụng trong trị liệu.

Một phương án khác của sáng chế đề xuất hợp chất NRG4 để sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa HFrEF, trong đó hợp chất NRG4 được sử dụng trong 24-96 giờ.

Một phương án khác của sáng chế đề xuất hợp chất NRG4 để sử dụng trong sản xuất thuốc điều trị hoặc ngăn ngừa HFrEF, trong đó hợp chất NRG4 được sử dụng trong 24-96 giờ.

Một phương án khác của sáng chế đề xuất dược phẩm chứa hợp chất NRG4 theo sáng chế và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được sử dụng.

Một phương án khác của sáng chế đề xuất dụng cụ bơm chứa hợp chất NRG4 theo sáng chế. Theo một số phương án, bơm là bơm dạng dán.

Mô tả chi tiết sáng chế

NRG4 là một trong bốn thành viên của họ protein NRG, chúng là một phần của họ protein lớn hơn được gọi là protein yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGF). Họ protein EGF bao gồm bản thân EGF, cũng như các protein khác, được gọi là protein giống EGF, có chung các đặc điểm cấu trúc nhất định tương tự như EGF. Các protein giống EGF bao gồm NRG1, NRG2, NRG3 và NRG4, cũng như yếu tố tăng trưởng giống EGF liên kết với heparin (HB-EGF), yếu tố chuyển đổi tăng trưởng- α , amphiregulin (AR), epiregulin (EPR), epigen, betacellulin (BTC) và các đồng dạng khác nhau của các protein này. Trong khi các phối tử này là protein màng ngoài tế bào, các tác nhân kích thích tế bào khác nhau dẫn đến sự hoạt hóa metalloprotease tế bào dẫn đến giải phóng protein phân giải miền EGF của protein, miền này sau đó tự do liên kết với thụ thể và khởi phát quá trình truyền tín hiệu. Các thành viên khác nhau của họ protein EGF có một loạt các tác động liên quan đến sự phát triển đa dạng, bao gồm các tác động liên quan đến sự phát triển bình thường cũng như bệnh lý của nhiều bệnh, bao gồm cả ung

thư. Các tác động này được gián tiếp thông qua các tương tác với một phân họ của bốn tyrosin kinaza thụ thể được gọi là họ ErbB của các thụ thể: EGFR (ErbB-1), HER2 (ErbB-2), HER3 (ErbB-3), HER4 (ErbB-4), và các đồng dạng của các thụ thể này. Bản thân các thành viên của họ NRG có những tác động khác nhau gián tiếp qua các tương tác cụ thể của chúng với EGFR, HER3 và HER4. Trong khi HER2 không liên kết các thành viên của họ NRG, HER2 tạo điều kiện cho việc truyền tín hiệu xuôi dòng bằng cách hình thành các heterodime với EGFR, HER3 và HER4 khi chúng được liên kết với nhau. Do đó, các tham chiếu được đưa ra ở đây về hoạt tính HER3 (hoặc HER3/2 hoặc HER2/3) hoặc HER4 (hoặc HER4/2 hoặc HER2/4) nên được hiểu là hoạt tính mà là kết quả của việc truyền tín hiệu xuôi dòng sau sự liên kết của phối tử, chẳng hạn như thành viên của họ NRG, với HER3 hoặc HER4, và sự heterodime hóa tiếp theo của thụ thể được liên kết đó với HER2.

Như nêu trên, các thành viên khác nhau của họ NRG có các tác động khác nhau qua trung gian của các profin hoạt tính và ái lực thụ thể khác nhau. Ví dụ, các hợp chất NRG1 tương tác với các miền ngoại bào của HER3 và HER4, và đóng một vai trò trong sự phát triển bình thường của nhiều cơ quan và trong cơ chế sinh bệnh học của bệnh ung thư. Sự liên kết HER4, và hoạt tính tạo ra từ đó, có liên quan đến chức năng tim và cải thiện cấu trúc, trong khi sự liên kết HER3 và hoạt tính tạo ra từ đó có liên quan đến bệnh ung thư, chứng buồn nôn, tiêu chảy và nhiễm độc gan. Ví dụ, xem O'Shea S, Johnson K, Clark R, Sliwkowski MX, Erickson SL. *Effects of in vivo heregulin beta1 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, Brás-Silva C. *Therapeutic potential of neuregulin-1 in cardiovascular disease*. DRUG DISCOV TODAY. 2013;18(17-18):836-42. Review. Mặt khác, NRG4 liên kết và hoạt hóa HER4 nhưng có ít hoặc không có sự liên kết hoặc hoạt tính tại HER3.

NRG4 được biểu hiện dưới dạng protein tiền chất axit amin 115 có trình tự được nêu trong SEQ ID NO:3:

```
MPTDHEEPCG  PSHKSFCLNG  GLCYVIPTIP  SPFCRCVENY
TGARCEEVFL  PGSSIQTMSN  LFEAFVALAV  LVTLIIGAFY
FLCRKGHFQR  ASSVQYDINL  VETSSTSAHH  SHEQH
```

(SEQ ID NO:3). Protein được biểu hiện là protein xuyên màng, có một phần xuyên màng, một phần tế bào chất và một phần ngoại bào, bao gồm phần EGF được giải phóng theo cách phân giải protein khi có kích thích tế bào. Các hợp chất NRG4 theo sáng chế bao gồm phần protein được biểu hiện được mô tả nêu trên (SEQ ID NO:3) từ axit amin số 4-50, nằm trong phần ngoại bào của protein được biểu hiện, như được nêu dưới đây trong SEQ ID NO:1:

DHEEPCGPSH KSFCLNGGLC YVIPTIPSPF CRCVENYTGA RCEEVFL

(SEQ ID NO:1). Để tránh nghi ngờ, việc đánh số ở đây của bất kỳ sự cải biến axit amin nào trong ngữ cảnh hợp chất NRG4 theo sáng chế dựa trên trình tự nêu trên trong SEQ ID NO:1.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “hợp chất NRG4” có nghĩa là protein hoặc peptit bao gồm tất cả hoặc một phần trình tự axit amin của SEQ ID NO:1, hoặc một biến thể hoặc liên hợp của chúng. Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "biến thể" dùng để chỉ trình tự axit amin có một hoặc nhiều cải biến đối với trình tự axit amin của protein người. Những cải biến như vậy bao gồm việc thay thế một hoặc nhiều axit amin trong trình tự tự nhiên của người bằng một axit amin tự nhiên hoặc không tự nhiên khác và/hoặc loại bỏ hoặc bổ sung một hoặc nhiều axit amin trong trình tự tự nhiên của người. Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “trình tự liên hợp” dùng để chỉ protein hoặc peptit bao gồm tất cả hoặc một phần của SEQ ID NO:1, hoặc một biến thể của chúng và được gắn với protein, peptit hoặc gốc hóa học khác bằng liên kết cộng hóa trị. Các phần đính kèm như vậy bao gồm, ví dụ, các vùng Fc của IgG, albumin người, peptit giàu glyxin hoặc các gốc axit béo. Ngoài ra, trừ khi có quy định rõ ràng khác, khi hợp chất NRG4 được mô tả theo một phương án hoặc được nêu trong một điểm yêu cầu bảo hộ trong bản mô tả này, cần hiểu rằng hợp chất này có thể ở dạng tự do hoặc dạng muối.

Sáng chế đề xuất các hợp chất NRG4 có công thức là SEQ ID NO:1, với một hoặc nhiều cải biến, và có ái lực với HER4 và hoạt tính liên quan đến liên kết HER4 mạnh hơn so với NRG4 tự nhiên của người, và ít nhất là có tính chọn lọc trong liên kết với thụ thể HER4 so với thụ thể HER3 như NRG4 tự nhiên của người. Ái lực với và hiệu lực tại các thụ thể HER4 và HER3 có thể được xác định bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm cả những kỹ thuật được mô tả trong các Ví dụ dưới đây. Theo một số phương án nhất định, hợp chất NRG4 theo sáng chế có hiệu lực do liên kết

HER4, ít nhất là 50% hiệu lực tối đa của miền EGF của NRG1 tự nhiên của người. Theo một số phương án nhất định, hợp chất NRG4 theo sáng chế có hiệu lực do liên kết HER4 lên đến 90% hiệu lực tối đa của miền EGF NRG1 tự nhiên của người.

Khi được sử dụng ở đây để mô tả các hợp chất NRG4 nhất định, thuật ngữ “không có hoạt tính liên quan đến liên kết HER3” có nghĩa là các hợp chất đó không có hoạt tính liên quan đến liên kết HER3 lớn hơn so với hoạt tính của NRG4 tự nhiên khi được thử nghiệm bằng các thử nghiệm in vitro như được mô tả trong các ví dụ dưới đây.

Các hợp chất NRG4 theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều cải biến đối với trình tự axit amin nêu trên trong SEQ ID NO:1, bao gồm ít nhất sự thay thế của D ở vị trí 1 bằng G (tức là D1G). Sự thay thế D1G được phát hiện là cải thiện đáng kể liên kết với HER4 mà không ảnh hưởng tiêu cực đến tính chọn lọc đối với HER3, kể cả trong ngữ cảnh các hợp chất NRG4 có chứa các cải biến bổ sung đối với trình tự axit amin NRG4 kiểu đại. Các cải biến axit amin khác được phát hiện có tác dụng có lợi - ví dụ, về liên kết HER4 và/hoặc tính chọn lọc liên quan đến HER3 - kết hợp với D1G theo một số phương án được ưu tiên của sáng chế bao gồm các cải biến ở một hoặc nhiều vị trí 8, 22, 26, 35 và 44, bao gồm cụ thể một hoặc nhiều điều sau: P8E, V22Q, I26F, E35A, E44H và E44K. Các phương án được ưu tiên đặc biệt của hợp chất NRG4 theo sáng chế là các biến thể ba có sự kết hợp của ba sự thay thế axit amin được chọn từ danh sách sau: D1G/I26F/E44K; D1G/I26F/P8E; D1G/I26F/E44H; và D1G/V22Q/E44K. Phương án được ưu tiên nhất của hợp chất NRG4 theo sáng chế bao gồm ba sự thay thế axit amin sau: D1G/V22Q/E44K, như được nêu trong SEQ ID NO:4:

GHEEPCGPSHKSFCLNGGLCYQIPTIPSPFCRCVENYTGARCEKVFL

(SEQ ID NO:4)

Theo một số phương án nhất định, các hợp chất NRG4 theo sáng chế cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều axit amin ở đầu tận cùng C hoặc N của trình tự nêu trên trong SEQ ID NO:1 mà sẽ được thấy ở protein được biểu hiện chiều dài đầy đủ được nêu trong SEQ ID NO:3, với điều kiện việc bao gồm các axit amin như vậy không loại bỏ liên kết mạnh hơn gốc và hoạt tính ở HER4 hoặc tính chọn lọc liên quan đến HER3.

Theo một số phương án nhất định, các hợp chất NRG4 theo sáng chế cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều axit amin bổ sung hoặc các nhóm hóa học khác không được thấy trong protein có chiều dài đầy đủ được nêu trong SEQ ID NO:3. Ví dụ, một số hợp

chất NRG4 theo sáng chế được liên hợp với protein, peptit giàu glyxin và/hoặc nhóm hóa học khác bằng liên kết cộng hóa trị. Theo một số phương án, hợp chất NRG4 theo sáng chế bao gồm peptit giàu glyxin bao gồm trình tự (GGGGX λ)_n, trong đó X λ là Q, A, E hoặc S và trong đó n = 1-5 (SEQ ID NO:5). Theo một số phương án nhất định, hợp chất NRG4 theo sáng chế bao gồm trình tự được nêu trong SEQ ID NO:5, trong đó X λ là S và n = 1 ở đầu tận cùng N.

Theo một số phương án nhất định, hợp chất NRG4 theo sáng chế có công thức: X₀GHEEPCGX₈SHKSFCLNGGLCYX₂₂IPTX₂₆PSPFCRCVX₃₅NYTGARCE X₄₄VFL; trong đó: X₀ được chọn từ nhóm bao gồm T, PT, MPT, S, GS, GGS, GGGs và (GGGGX λ)_n trong đó X λ là Q, A, E hoặc S và n=1-5 (SEQ ID NO:5), hoặc không có mặt; X₈ là E hoặc P; X₂₂ là Q hoặc V; X₂₆ là F hoặc I; X₃₅ là E hoặc A; và X₄₄ là H, K hoặc E (SEQ ID NO: 2).

Theo các phương án nhất định, X₈ là P; X₂₂ là V; X₂₆ là I; X₃₅ là E; và X₄₄ là E. Theo các phương án khác, X₈ là E; X₂₂ là V; X₂₆ là I; X₃₅ là E; và X₄₄ là E. Theo các phương án khác, X₈ là P; X₂₂ là Q; X₂₆ là I; X₃₅ là E; và X₄₄ là E. Theo các phương án khác, X₈ là P; X₂₂ là V; X₂₆ là F; X₃₅ là E; và X₄₄ là E. Theo các phương án khác, X₈ là P; X₂₂ là V; X₂₆ là I; X₃₅ là A; và X₄₄ là H hoặc E. Theo các phương án khác, X₈ là P; X₂₂ là V; X₂₆ là F; X₃₅ là E; và X₄₄ là K. Theo các phương án khác, X₈ là P; X₂₂ là V; X₂₆ là F; X₃₅ là E; và X₄₄ là H. Theo các phương án khác, X₈ là E; X₂₂ là V; X₂₆ là F; X₃₅ là E; và X₄₄ là E. Theo các phương án được ưu tiên, X₈ là P; X₂₂ là Q; X₂₆ là I; X₃₅ là E; và X₄₄ là K.

Theo một số phương án nhất định, hợp chất NRG4 theo sáng chế bao gồm vùng Fc của IgG. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vùng Fc của IgG” dùng để chỉ vùng không đổi của đoạn kháng thể IgG của người. Cụ thể, vùng Fc bao gồm các miền hằng định CH2 và CH3 của kháng thể, và cũng có thể bao gồm một số hoặc tất cả các vùng bản lề. Các vùng Fc của IgG bao gồm trong một số hợp chất NRG4 theo sáng chế có thể bao gồm các đoạn của vùng không đổi từ một chuỗi nặng của kháng thể IgG hoặc hai chuỗi nặng, được liên kết với nhau thông qua tương tác không cộng hóa trị và liên kết disulfua. Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ vùng Fc của IgG cũng bao gồm các phiên bản của các đoạn kháng thể này đã được cải biến, kéo dài và/hoặc cắt ngắn, ví dụ, để thay đổi tính chất hoặc đặc điểm của hợp chất NRG4, chẳng hạn như hiệu lực và/hoặc

được động học của nó. Theo một số phương án của sáng chế, các vùng Fc của IgG người cũng có thể có một số hoặc tất cả các vùng bản lề bị loại bỏ để đơn giản hóa sự dime hóa Fc qua trung gian disulfua. Các vùng Fc của IgG theo một số phương án nhất định của sáng chế bao gồm các dime của hai chuỗi nặng có trình tự axit amin khác nhau, có thể được điều chế bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, Lewis SM, et al. NAT. BIOTECHNOL. 32(2):191-8 (2014); Carter, J. IMMUNOL. METHODS, 248(1-2):7-15 (2001); Ridgway, J. B. et al. Protein Eng. 9 (7): 617-2 (1996).

Một vùng Fc của IgG được ưu tiên là dime của hai chuỗi axit amin sau:

ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTQVHQLNGKEYKCKVSNKGLP
APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:6); và

ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTQVHQLNGKEYKCKVSNKGLP
APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:7).

Một vùng Fc của IgG được ưu tiên khác là dime của hai chuỗi axit amin sau:

ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTQVHQLNGKEYKCKVSNKGLP
APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNA
YTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:8); và

ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTQVHQLNGKEYKCKVSNKGLP
APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNA
YTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:9).

Theo một số phương án, trong đó hợp chất NRG4 theo sáng chế bao gồm vùng Fc của IgG, vùng Fc của IgG được gắn bằng trình tự liên kết. Theo một số phương án, trình tự liên kết là trình tự liên kết peptit bao gồm trình tự được nêu trên trong SEQ ID NO:5, trong đó X_λ là Q, A, E hoặc S và n = 1-5. Theo một số phương án nhất định, trình tự liên kết bao gồm trình tự SEQ ID NO:5, trong đó X_λ là S và n là 3. Theo một số phương án, trong đó hợp chất NRG4 theo sáng chế bao gồm vùng Fc của IgG được gắn bằng trình tự liên kết peptit, gốc ở đầu tận cùng N của trình tự liên kết peptit được

dung hợp trực tiếp với gốc ở đầu tận cùng C của một chuỗi của vùng Fc của IgG và gốc ở đầu tận cùng N của chất chủ vận NRG4 được dung hợp trực tiếp với gốc ở đầu tận cùng C của trình tự liên kết peptit.

Việc đưa các vùng Fc của IgG vào một số hợp chất NRG4 theo sáng chế có thể có những lợi thế liên quan đến sản xuất và/hoặc sử dụng. Về sản xuất, các hợp chất như vậy có thể được sản xuất nhanh chóng bằng cách sử dụng các kỹ thuật biểu hiện sinh học đã biết trong lĩnh vực này, chẳng hạn như các kỹ thuật được mô tả trong các ví dụ dưới đây. Việc sản xuất nhanh chóng bằng cách sử dụng các kỹ thuật này mang lại hiệu quả trong tất cả các giai đoạn nghiên cứu và phát triển, đặc biệt là trong việc sản xuất các biến thể NRG4 để sàng lọc sự liên kết và/hoặc hoạt tính. Về việc sử dụng, các hợp chất NRG4 bao gồm các vùng Fc của IgG có thể có profin được động học kéo dài, bao gồm cả phơi nhiễm trong huyết thanh lâu khoảng 14 ngày.

Tuy nhiên, mặc dù có những ưu điểm đó, cũng phát hiện ra rằng việc tiếp xúc kéo dài với NRG4, bao gồm cả phơi nhiễm trong huyết thanh lâu hơn 8 ngày, có thể gây ra nguy cơ nhiễm độc tim, như được nêu trong các ví dụ dưới đây. Cũng phát hiện ra rằng nguy cơ độc tính có thể giảm bớt, mặc dù không được loại bỏ ở tất cả các loài, bằng cách điều chế các hợp chất (ví dụ, thông qua việc sử dụng các vùng Fc đã được cải biến) với thời gian bán hủy được động học ngắn hơn một chút, bao gồm cả thời gian phơi nhiễm trong huyết thanh khoảng 8 ngày.

Cũng phát hiện ra rằng việc phơi nhiễm ngắn hơn với các hợp chất NRG4, so với thời gian phơi nhiễm 8-14 ngày được mô tả nêu trên, có khả năng mang lại hiệu quả kéo dài và đầy đủ mà không có nguy cơ gây độc cho tim của các hợp chất NRG4 được mô tả trong các đoạn trên. Ví dụ về thời lượng phơi nhiễm như vậy là từ khoảng 1 đến khoảng 7 ngày, tốt hơn là 2, 3 hoặc 4 ngày. Do đó, theo một số phương án, sáng chế mô tả phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa HFrEF, trong đó hợp chất NRG4 được sử dụng với lượng đủ để cung cấp nồng độ huyết thanh hiệu quả điều trị trong khoảng 24 đến khoảng 168 giờ. Theo một số phương án nhất định, hợp chất NRG4 được sử dụng với lượng đủ để cung cấp nồng độ huyết thanh hiệu quả điều trị trong khoảng 24 đến khoảng 96 giờ. Theo một số phương án nhất định, hợp chất NRG4 được sử dụng với lượng đủ để cung cấp nồng độ huyết thanh hiệu quả điều trị trong khoảng 24 giờ. Theo một số phương án nhất định, hợp chất NRG4 được sử dụng với lượng đủ để cung cấp nồng độ

huyết thanh hiệu quả điều trị trong khoảng 48 giờ. Theo một số phương án nhất định, hợp chất NRG4 được sử dụng với lượng đủ để cung cấp nồng độ huyết thanh hiệu quả điều trị trong khoảng 72 giờ. Theo một số phương án nhất định, hợp chất NRG4 được sử dụng với lượng đủ để cung cấp nồng độ huyết thanh hiệu quả điều trị trong khoảng 96 giờ.

Khoảng thời gian tiếp xúc được mô tả trong đoạn trên có thể đạt được bằng cách cung cấp các liều tiêm nhanh các hợp chất NRG4 có profin được động học cho phép phối nhiễm huyết thanh trong khoảng thời gian được mô tả trong đoạn trên, hoặc thông qua việc sử dụng liên tục (ví dụ, thông qua việc sử dụng bơm) hợp chất NRG4 thanh thải nhanh trong khoảng thời gian được mô tả trong đoạn trên.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “hiệu quả kéo dài” dùng để chỉ những cải thiện liên quan đến suy tim kéo dài ngoài khoảng thời gian mà hợp chất NRG4 được sử dụng. Ví dụ, theo một số phương án, trong đó hợp chất NRG4 được sử dụng với lượng đủ để cung cấp nồng độ huyết thanh hiệu quả điều trị trong 72 giờ, theo một số phương án, hiệu quả của phác đồ điều trị như vậy có thể duy trì trong một khoảng thời gian từ khoảng 6 ngày ($\sim 2X$ thời gian sử dụng) đến khoảng 4 tháng ($\sim 30X$ thời gian sử dụng). Khoảng thời gian hiệu quả (tức là khoảng thời gian mà lợi ích lâm sàng được nhìn thấy) so với thời gian dùng thuốc (tức là khoảng thời gian mà nồng độ huyết thanh có hiệu quả điều trị được cung cấp) được xác định theo một số phương án nhất định ở đây là “hiệu quả:tỷ lệ sử dụng.” Theo một số phương án, tỷ lệ hiệu quả:sử dụng nằm trong khoảng từ 2 đến 50. Theo một số phương án, tỷ lệ hiệu quả:sử dụng nằm trong khoảng từ 20 đến 45. Theo một số phương án, tỷ lệ hiệu quả:sử dụng là khoảng 22, khoảng 30, hoặc khoảng 45.

Hiệu quả kéo dài như vậy cho phép sử dụng hợp chất NRG4 tương đối không thường xuyên với một lượng đủ để cung cấp nồng độ huyết thanh hiệu quả điều trị trong khoảng thời gian mong muốn. Theo một số phương án, hợp chất NRG4 được sử dụng sáu tháng một lần. Theo một số phương án, hợp chất NRG4 được sử dụng không thường xuyên hơn một lần mỗi tuần. Theo các phương án khác, hợp chất NRG4 được sử dụng hai tháng một lần. Theo các phương án khác, hợp chất NRG4 được sử dụng mỗi tháng một lần. Theo một số phương án được ưu tiên, hợp chất NRG4 được sử dụng mỗi quý

một lần. Theo các phương án được ưu tiên khác, hợp chất NRG4 được sử dụng sáu tháng một lần.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “điều trị” hoặc “để điều trị” bao gồm việc ngăn chặn, làm chậm, chấm dứt, hoặc đảo ngược sự tiến triển hoặc mức độ nghiêm trọng của triệu chứng hoặc rối loạn đã có. Điều trị suy tim hoặc HFrEF theo sáng chế có thể được phản ánh trong một hoặc nhiều biện pháp khác nhau liên quan đến suy tim, bao gồm, ví dụ, tăng phân suất tống máu thất trái (LVEF), tăng thể tích khoang thất trái ở cuối tâm thu (LVESV), giảm áp lực cuối tâm trương thất trái (LVEDP), giảm nguy cơ tử vong do CV và/hoặc nhập viện do suy tim, giảm nguy cơ tử vong toàn bộ, giảm nguy cơ nhồi máu cơ tim (MI), giảm nguy cơ đột quỵ, giảm nguy cơ cần cấy ghép thiết bị hỗ trợ thất trái (LVAD) và/hoặc ghép tim, cải thiện các triệu chứng và hạn chế thể chất của suy tim và/hoặc cải thiện chất lượng cuộc sống (QoL). Một số lợi ích nhất định của việc điều trị theo các phương án của sáng chế có thể đạt được sau khi điều trị ít nhất 1 tháng. Một số lợi ích nhất định của việc điều trị theo các phương án của sáng chế có thể đạt được sau khi điều trị ít nhất 6 tháng. Một số lợi ích nhất định của việc điều trị theo các phương án của sáng chế có thể đạt được sau khi điều trị ít nhất 1 năm.

Theo một số phương án, việc sử dụng hợp chất NRG4 theo sáng chế dẫn đến cải thiện đáng kể LVEF. Theo một số phương án, việc sử dụng hợp chất NRG4 theo sáng chế dẫn đến cải thiện LVEF ít nhất 5%. Theo một số phương án, việc sử dụng hợp chất NRG4 theo sáng chế dẫn đến cải thiện LVEF ít nhất 5% sau 6 tháng điều trị. Theo một số phương án, việc sử dụng hợp chất NRG4 theo sáng chế dẫn đến cải thiện LVEF ít nhất 5% sau 1 năm điều trị. Theo một số phương án, việc sử dụng hợp chất NRG4 theo sáng chế dẫn đến cải thiện LVESV ít nhất 5% sau 1 năm điều trị. Theo một số phương án, việc sử dụng hợp chất NRG4 theo sáng chế dẫn đến giảm LVEDP đáng kể sau 1 năm điều trị. Theo một số phương án, việc sử dụng hợp chất NRG4 theo sáng chế dẫn đến việc giảm đáng kể tỷ lệ biến dạng dọc hình cầu (GLS). Theo một số phương án, việc sử dụng hợp chất NRG4 theo sáng chế dẫn đến giảm GLS ít nhất 3,5%. Theo một số phương án nhất định, việc sử dụng các hợp chất NRG4 theo sáng chế dẫn đến giảm ít nhất 15% nguy cơ tử vong do CV và/hoặc nhập viện do HF. Theo một số phương án nhất định, việc sử dụng hợp chất NRG4 theo sáng chế dẫn đến giảm đáng kể nguy cơ một hoặc nhiều tổng số tử vong, MI, đột quỵ, cấy ghép LVAD hoặc cấy ghép tim. Theo

một số phương án, việc sử dụng các hợp chất NRG4 theo sáng chế dẫn đến cải thiện đáng kể các triệu chứng và giới hạn thể chất của bệnh suy tim và/hoặc QoL.

Ngoài ra, như đã lưu ý nêu trên, việc sử dụng các hợp chất NRG4 theo một số phương án nhất định của sáng chế có khả năng cải thiện các biện pháp liên quan đến suy tim, chẳng hạn như các biện pháp được mô tả nêu trên, mà không làm tăng rủi ro an toàn. Do đó, theo các phương án được ưu tiên, việc sử dụng hợp chất NRG4 theo sáng chế không làm tăng các nguy cơ về an toàn như tăng chứng hạ huyết áp; chức năng thận xấu đi; mất cân bằng điện giải; rối loạn chức năng gan; tỷ lệ mắc các khối u hoặc giảm thiếu máu dai dẳng.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ “lượng có hiệu quả điều trị” dùng để chỉ số lượng hoặc liều lượng của hợp chất NRG4 mang lại hiệu quả mong muốn ở bệnh nhân. Trong trường hợp các hợp chất NRG4 có profin được động học kéo dài, liều như vậy có thể là lượng được cung cấp khi dùng một hoặc nhiều liều. Trong trường hợp các hợp chất có tác dụng nhanh hơn được sử dụng trong một khoảng thời gian, chẳng hạn như truyền 24-96 giờ như mô tả nêu trên, liều lượng hoặc số lượng có thể được biểu thị bằng tổng khối lượng của hợp chất NRG4 được sử dụng trong khoảng thời gian đó, ví dụ, tổng số mg, hoặc tốc độ mà hợp chất NRG4 được sử dụng trong thời gian đó, ví dụ, mg/phút, hoặc nồng độ trong huyết tương của hợp chất NRG4 trong thời gian dùng thuốc. Lượng hữu hiệu có thể dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực nhờ việc sử dụng các kỹ thuật đã biết và bằng cách quan sát kết quả thu được từ những ca tương tự. Theo một số phương án nhất định, liều lượng sử dụng mỗi quý một lần có thể nằm trong phạm vi liều lượng đủ để cung cấp nồng độ trong huyết tương từ khoảng 3 đến khoảng 100 nM trong khoảng thời gian sử dụng.

Việc sử dụng các hợp chất NRG4 theo sáng chế thường là đường tiêm, ví dụ, tiêm tĩnh mạch (IV), tiêm dưới da (SC) hoặc trong phúc mạc (IP). Do đó, theo một số phương án của sáng chế, hợp chất NRG4 được sử dụng qua đường tĩnh mạch. Theo các phương án khác của sáng chế, hợp chất NRG4 được sử dụng trong phúc mạc. Theo các phương án khác, hợp chất NRG4 được tiêm dưới da.

Để kiểm soát thời gian phơi nhiễm nhằm đạt được hiệu quả tối ưu và duy trì với mức độ độc hại đủ lớn đối với tim, tốt nhất là dùng đường tiêm các hợp chất NRG4 bằng cách truyền liên tục hoặc ngắt quãng. Ví dụ, nhiều loại bơm truyền dịch được sử dụng

để truyền nhiều loại thuốc và những bơm như vậy có thể được sử dụng để truyền các hợp chất NRG4 theo sáng chế. Gần đây hơn, bơm dạng dán đã được phát triển nhỏ hơn các thiết bị truyền thống và gắn trực tiếp vào da của bệnh nhân, giúp giảm thiểu sự can thiệp vào các hoạt động hàng ngày của bệnh nhân. Do đó, theo một số phương án, hợp chất NRG4 được sử dụng bằng bơm tiêm truyền hoặc bơm dạng dán. Tốt hơn là các hợp chất NRG4 được sử dụng bằng dạng dán.

Sáng chế cũng đề cập đến các chất trung gian và quy trình mới hữu ích cho việc sản xuất các hợp chất NRG4 theo sáng chế. Các chất trung gian và hợp chất NRG4 theo sáng chế có thể được điều chế bằng nhiều quy trình khác nhau đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm các quy trình sử dụng tổng hợp hóa học hoặc biểu hiện sinh học, chẳng hạn như các quy trình được mô tả trong các ví dụ dưới đây.

Đối với tổng hợp hóa học, các bước tổng hợp cụ thể cho từng lộ trình được mô tả có thể được kết hợp theo những cách khác nhau để điều chế hợp chất NRG4 theo sáng chế. Các chất phản ứng và nguyên liệu ban đầu đều dễ dàng kiếm được đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Đối với biểu hiện sinh học, các hợp chất sẽ được biểu hiện trong tế bào chủ sau khi các trình tự đã được liên kết theo kiểu hoạt động với trình tự kiểm soát biểu hiện. Các hợp chất có thể dễ dàng được sản xuất trong tế bào động vật có vú như tế bào CHO, NSO, HEK293, BHK, hoặc COS; trong tế bào vi khuẩn như *E. coli*, *Bacillus subtilis*, hoặc *Pseudomonas fluorescens*; trong tế bào côn trùng, hoặc trong tế bào nấm hoặc nấm men, chúng được nuôi cấy bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này. Các vector chứa các trình tự polynucleotit cần quan tâm có thể được chuyển vào tế bào chủ bằng các phương pháp đã biết rõ, mà có thể thay đổi tùy theo loại tế bào chủ. Các phương pháp tinh chế protein khác nhau có thể được sử dụng và các phương pháp này đã được biết đến trong lĩnh vực này.

Như đã nói nêu trên, tất cả bệnh nhân HF, ngay cả những người có triệu chứng nhẹ đều có nguy cơ tử vong cao. Do đó, khi được sử dụng ở đây, đề cập đến “bệnh nhân cần” điều trị suy tim (HF) có thể đề cập đến một loạt các cá nhân bị HF, bao gồm cả những người có mức độ nghiêm trọng của bệnh như được mô tả dưới đây. Hiệp hội Tim mạch New York (NYHA) đã cung cấp một sơ đồ phân loại cho mức độ hoặc mức độ nghiêm trọng của HF, như được tóm tắt dưới đây trong Bảng 1:

Phân loại NYHA	Các triệu chứng
I	Không giới hạn hoạt động thể chất. Hoạt động thể chất bình thường không gây mệt mỏi quá mức, tim đập nhanh, chứng khó thở (hụt hơi).
II	Hạn chế nhẹ hoạt động thể chất. Thoải mái khi nghỉ ngơi. Hoạt động thể chất bình thường dẫn đến mệt mỏi, tim đập nhanh, chứng khó thở (hụt hơi).
III	Hạn chế rõ rệt của hoạt động thể chất. Thoải mái khi nghỉ ngơi. Ít hoạt động bình thường hơn gây ra mệt mỏi, tim đập nhanh hoặc chứng khó thở.
IV	Không thể thực hiện bất kỳ hoạt động thể chất nào mà không thấy khó chịu. Các triệu chứng của suy tim khi nghỉ ngơi. Nếu bất kỳ hoạt động thể chất nào được thực hiện, sự khó chịu sẽ tăng lên.

Bảng 1.

Theo một số phương án, bệnh nhân cần điều trị bị suy tim NYHA nhóm II-IV. Theo một số phương án, bệnh nhân cần điều trị bị suy tim NYHA nhóm II. Theo một số phương án, bệnh nhân cần điều trị bị suy tim NYHA nhóm III. Theo một số phương án, bệnh nhân cần điều trị bị suy tim NYHA nhóm IV. Theo một số phương án, bệnh nhân cần điều trị bị suy tim NYHA nhóm II-III.

Như đã đề cập nêu trên, các lựa chọn điều trị trị liệu hiện có cho bệnh suy tim, bao gồm tiêu chuẩn chăm sóc hiện tại, cải thiện các triệu chứng và làm chậm sự tiến triển của bệnh thông qua các cơ chế huyết động học - ví dụ, giảm huyết áp, nhịp tim và/hoặc thể tích huyết tương - để giảm khối lượng công việc của tim đang bị suy. Ngược lại, các hợp chất NRG4 theo sáng chế đạt được tác dụng của chúng thông qua một cơ chế hoạt động khác, cụ thể là liên kết HER4 có chọn lọc và hoạt động tạo ra từ đó, giúp cải thiện trực tiếp sự sống còn của tế bào cơ tim và chuyển hóa tế bào và thúc đẩy tái tạo cơ tim. Do các cơ chế hoạt động khác nhau này, các hợp chất NRG4 theo sáng chế có thể được sử dụng trên SoC hiện có mà không cần chuẩn độ hoặc theo dõi. Do đó, theo một số phương án, hợp chất NRG4 theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với một hoặc nhiều phương pháp điều trị bổ sung cho bệnh suy tim. Theo một số phương án, một hoặc nhiều phương pháp điều trị bổ sung cho bệnh suy tim được chọn từ nhóm bao gồm thuốc chẹn beta, thuốc ức chế ACE, ARB, MRA, thuốc lợi tiểu, ivabradine và sacubitril/valsartan (ENTRESTO®). Theo một số phương án, hợp chất NRG4 theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với chất ức chế SGLT2 hoặc chất hoạt hóa sGC.

Các hợp chất NRG4 theo sáng chế cũng có thể có công dụng trong việc điều trị các bệnh hoặc tình trạng khác, bao gồm nhưng không giới hạn ở suy tim với phân suất tống máu được bảo toàn (HFpEF), các rối loạn hoặc tình trạng liên quan đến tim khác, bệnh Parkinson, bệnh Alzheimer, hội chứng ruột kích thích, rối loạn xương, bệnh thận, bệnh tiểu đường, bệnh chuyển hóa, bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD) và viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NASH).

Các phương án bổ sung được mô tả dưới đây:

Hợp chất NRG4 bao gồm sự cải biến gốc D ở vị trí 1 thành gốc G và lên đến năm cải biến bổ sung so với trình tự axit amin của NRG4 người (SEQ ID NO:1).

Hợp chất NRG4 theo phương án trên có không quá 4 cải biến bổ sung. Theo một phương án, hợp chất NRG4 có không quá 3 cải biến bổ sung. Theo một phương án, hợp chất NRG4 có không quá 2 cải biến bổ sung.

Hợp chất NRG4 theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả nêu trên, trong đó hợp chất này bao gồm ít nhất một cải biến ở vị trí được chọn từ nhóm bao gồm 8, 22, 26, 35 và 44.

Hợp chất có công thức:

X_0 GHEEPCGX₈SHKSFCLNGGLCYX₂₂IPTX₂₆PSPFCRCVX₃₅NYTGARCE X₄₄VFL; trong đó: X₀ được chọn từ nhóm bao gồm T, PT, MPT, S, GS, GGS, GGGS và (GGGGX_λ)_n trong đó X_λ là Q, A, E hoặc S và n=1-5 (SEQ ID NO:5), hoặc không có mặt; X₈ là E hoặc P; X₂₂ là Q hoặc V; X₂₆ là F hoặc I; X₃₅ là E hoặc A; và X₄₄ là H, K hoặc E (SEQ ID NO: 2).

Hợp chất theo phương án nêu trên, trong đó X₈ là P; X₂₂ là V; X₂₆ là I; X₃₅ là E; và X₄₄ là E.

Hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả nêu trên, trong đó X₈ là E; X₂₂ là V; X₂₆ là I; X₃₅ là E; và X₄₄ là E.

Hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả nêu trên, trong đó X₈ là P; X₂₂ là Q; X₂₆ là I; X₃₅ là E; và X₄₄ là E.

Hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả nêu trên, trong đó X₈ là P; X₂₂ là V; X₂₆ là F; X₃₅ là E; và X₄₄ là E.

Hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả nêu trên, trong đó X₈ là P; X₂₂ là V; X₂₆ là I; X₃₅ là A; và X₄₄ là H hoặc E.

Hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả nêu trên, trong đó X_8 là P; X_{22} là V; X_{26} là F; X_{35} là E; và X_{44} là K.

Hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả nêu trên, trong đó X_8 là P; X_{22} là V; X_{26} là F; X_{35} là E; và X_{44} là H.

Hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả nêu trên, trong đó X_8 là E; X_{22} là V; X_{26} là F; X_{35} là E; và X_{44} là E.

Hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án được mô tả nêu trên, trong đó X_8 là P; X_{22} là Q; X_{26} là I; X_{35} là E; và X_{44} là K.

Hợp chất theo phương án nêu trên, trong đó X_0 là SEQ ID NO:5 trong đó X_λ là S và $n=1$.

Hợp chất bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:4.

Hợp chất bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:10.

Hợp chất bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:11.

Hợp chất bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:12.

Hợp chất bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:13.

Hợp chất bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:14.

Hợp chất bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:15.

Hợp chất bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:16.

Hợp chất bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:17.

Hợp chất bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:18.

Hợp chất bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:19.

Hợp chất gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:18.

Hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó hợp chất được liên kết với protein, peptit hoặc gốc hóa học khác bằng liên kết cộng hóa trị. Hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó hợp chất được gắn với một hoặc nhiều vùng Fc của IgG, albumin người, peptit giàu glyxin hoặc gốc axit béo. Hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó hợp chất được gắn vào vùng Fc của IgG. Hợp chất theo phương án trên, trong đó vùng Fc của IgG bao gồm dime của SEQ ID NO:6 và SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:8 và SEQ ID NO:9. Hợp chất theo các phương án trên, trong đó X_0 là SEQ ID NO:5 trong đó X_λ là S và $n = 3$.

Hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó hợp chất có hoạt tính liên quan đến liên kết HER4 lớn hơn hoạt tính NRG4 tự nhiên của người.

Hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó hợp chất có hoạt tính liên quan đến liên kết HER4 ít nhất là 50% hoạt tính tối đa của NRG1 tự nhiên của người.

Hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó hợp chất có hoạt tính liên quan đến liên kết HER4 ít nhất là 70% hoạt tính tối đa của NRG1 tự nhiên của người.

Hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó hợp chất có hoạt tính liên quan đến liên kết HER4 ít nhất là 90% hoạt tính tối đa của NRG1 tự nhiên của người.

Hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, trong đó hợp chất không có hoạt tính liên quan đến liên kết HER3.

Dược phẩm chứa hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên.

Dụng cụ bơm bao gồm hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên.

Phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa HF ở bệnh nhân có nhu cầu, bao gồm việc sử dụng cho bệnh nhân một lượng hợp chất NRG4 có hiệu quả điều trị. Theo một phương án, hợp chất NRG4 là hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên.

Hợp chất NRG4 để sử dụng trong điều trị hoặc ngăn ngừa HFREF. Theo một phương án, hợp chất NRG4 là hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên.

Hợp chất NRG4 để sử dụng trong sản xuất thuốc để điều trị hoặc ngăn ngừa HFREF. Theo một phương án, hợp chất NRG4 là hợp chất theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên.

Theo một phương án, hợp chất được sử dụng trong 24-168 giờ. Theo một phương án, hợp chất được sử dụng trong 24-96 giờ. Theo một phương án, hợp chất được sử dụng trong 24, 48, 72 hoặc 96 giờ. Theo một phương án, hợp chất được sử dụng trong 96 giờ.

Theo một phương án, hợp chất này được sử dụng không thường xuyên hơn một lần mỗi tháng. Theo một phương án, hợp chất được sử dụng không thường xuyên hơn một lần mỗi quý (Q3M). Theo một phương án, hợp chất được sử dụng Q3M. Theo một phương án, hợp chất được sử dụng Q3M trong 96 giờ. Theo một phương án, hợp chất được sử dụng sáu tháng một lần.

Theo một phương án, tỷ lệ hiệu quả: liều dùng là từ khoảng 2 đến khoảng 50. Theo một phương án, tỷ lệ hiệu quả: liều dùng là từ khoảng 20 đến khoảng 45. Theo một phương án, tỷ lệ hiệu quả: liều dùng là khoảng 22, khoảng 30, hoặc khoảng 45.

Theo một phương án, việc điều trị được liên tục trong ít nhất 6 tháng.

Theo một phương án, việc điều trị được liên tục trong ít nhất 1 năm.

Theo một phương án, hợp chất này làm tăng LVEF đáng kể. Theo một phương án, hợp chất này làm tăng LVEF ít nhất 5%. Theo một phương án, hợp chất này giúp cải thiện 5% LVEF sau 1 năm điều trị.

Theo một phương án, hợp chất này làm tăng LVESV đáng kể. Theo một phương án, hợp chất này cải thiện 5% LVESV. Theo một phương án, hợp chất này giúp cải thiện 5% LVESV sau 1 năm điều trị.

Theo một phương án, hợp chất này làm giảm đáng kể LVEDP. Theo một phương án, hợp chất làm giảm đáng kể LVEDP sau 1 năm điều trị.

Theo một phương án, hợp chất làm giảm đáng kể tỷ lệ biến dạng dọc hình cầu (GLS). Theo một phương án, hợp chất này làm giảm GLS ít nhất 3,5%.

Theo một phương án, hợp chất này dẫn đến cải thiện đáng kể LVEDV.

Theo một phương án, hợp chất này làm giảm đáng kể nguy cơ tử vong do CV và/hoặc nhập viện do HF.

Theo một phương án, hợp chất này làm giảm ít nhất 15% nguy cơ tử vong do CV.

Theo một phương án, hợp chất này làm giảm ít nhất 15% nguy cơ nhập viện do HF.

Theo một phương án, hợp chất này làm giảm đáng kể nguy cơ một hoặc nhiều trong tổng số tử vong, MI, đột quy, cấy ghép LVAD hoặc cấy ghép tim.

Theo một phương án, hợp chất này dẫn đến cải thiện đáng kể các triệu chứng và hạn chế về thể chất của bệnh suy tim và/hoặc QoL.

Theo một phương án, hợp chất không dẫn đến: tăng huyết áp; chức năng thận xấu đi; mất cân bằng điện giải; rối loạn chức năng gan; tỷ lệ mắc các khối u hoặc giảm thiểu máu dai dẳng.

Theo một phương án, hợp chất được sử dụng ngoài đường tiêu hóa.

Theo một phương án, hợp chất được dùng theo đường tiêm tĩnh mạch, tiêm dưới da hoặc trong màng bụng.

Theo một phương án, hợp chất được sử dụng bằng bơm tiêm truyền.

Theo một phương án, hợp chất được sử dụng bằng bơm dạng dán.

Theo một phương án, lượng có hiệu quả điều trị là lượng hợp chất cung cấp nồng độ trong huyết thanh khoảng 3 đến khoảng 100 nM.

Theo một phương án, hợp chất này được sử dụng cho bệnh nhân suy tim NYHA nhóm II-IV.

Theo một phương án, hợp chất này được sử dụng cho bệnh nhân suy tim NYHA nhóm II-III.

Theo một phương án, hợp chất được sử dụng kết hợp đồng thời hoặc liên tiếp với một hoặc nhiều phương pháp điều trị bổ sung cho bệnh suy tim. Theo một phương án, một hoặc nhiều phương pháp điều trị bổ sung cho bệnh suy tim được chọn từ nhóm bao gồm thuốc chẹn beta, thuốc ức chế ACE, ARB, MRA, thuốc lợi tiểu, ivabradine và sacubitril/valsartan (ENTRESTO®). Theo một phương án, hợp chất được sử dụng kết hợp đồng thời hoặc liên tiếp với chất ức chế SGLT2 và/hoặc chất hoạt hóa sGC.

Theo một phương án, hợp chất NRG4 được sử dụng là hợp chất NRG4 theo sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được minh họa tiếp bằng các ví dụ sau đây, các ví dụ này không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Điều chế các hợp chất ví dụ

Ví dụ về các hợp chất NRG4 theo sáng chế được mô tả dưới đây trong Bảng 2.

Ví dụ	Sự cải biến NRG4	AA đầu tận cùng N/Trình tự liên kết	ID trình tự
1	D1G	SEQ ID NO:5 trong đó Xλ là S và n là 3	SEQ ID NO:10
2	D1G/P8E	SEQ ID NO:5 trong đó Xλ là S và n là 3	SEQ ID NO:11
3	D1G/V22Q	SEQ ID NO:5 trong đó Xλ là S và n là 3	SEQ ID NO:12
4	D1G/I26F	SEQ ID NO:5 trong đó Xλ là S và n là 3	SEQ ID NO:13
5	D1G/E35A	SEQ ID NO:5 trong đó Xλ là S và n là 3	SEQ ID NO:14

6	D1G/I26F/E44K	SEQ ID NO:5 trong đó Xλ là S và n là 3	SEQ ID NO:15
7	D1G/I26F/E44H	SEQ ID NO:5 trong đó Xλ là S và n là 3	SEQ ID NO:16
8	D1G/I26F/P8E	SEQ ID NO:5 trong đó Xλ là S và n là 3	SEQ ID NO:17
9	D1G/V22Q/E44K	SEQ ID NO:5 trong đó Xλ là S và n là 1	SEQ ID NO:18
10	D1G/V22Q/E44K	SEQ ID NO:5 trong đó Xλ là S và n là 3	SEQ ID NO:19
11	D1G/V22Q/E44K	SEQ ID NO:5 trong đó Xλ là S và n là 3	SEQ ID NO:19

Bảng 2. Các thành phần của các hợp chất NRG4 làm ví dụ. Trình tự axit amin hoàn chỉnh cho các hợp chất Ví dụ, không bao gồm trình tự vùng Fc của IgG bất kỳ, được nêu trong các SEQ ID NO được liệt kê trong cột thứ tư. Ví dụ 1-8 và 10-11 còn bao gồm các vùng Fc của IgG. Các vùng Fc của IgG của Ví dụ 1-8 và 10 bao gồm dime của SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7, trong đó axit amin đầu tận cùng N của trình tự được xác định trong cột thứ ba của bảng trên được dung hợp với axit amin đầu tận cùng C của SEQ ID NO: 7. Vùng Fc của IgG của Ví dụ 11 bao gồm dime của SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9, trong đó axit amin đầu tận cùng N của trình tự được xác định trong cột thứ ba của bảng trên được dung hợp với axit amin đầu tận cùng C của SEQ ID NO: 9.

Biểu hiện sinh học

Ví dụ về các hợp chất NRG4 bao gồm các vùng Fc được tạo ra trong hệ thống biểu hiện tế bào động vật có vú bằng cách sử dụng dòng tế bào CHO GSKO. Việc bất hoạt gen GS cho phép chọn lọc chính xác nghiêm ngặt bằng cách loại bỏ hoạt tính nền của GS nội sinh mà có thể cho phép các tế bào sinh sản thấp hoặc không sinh sản sót được trong các điều kiện chọn lọc. Các gen mã hóa cho chuỗi nút và chuỗi lỗ dung hợp Fc theo sáng chế có thể được tách dòng phụ thành các plasmid biểu hiện chứa glutamin synthetaza (GS) riêng lẻ để đồng chuyển nạp hoặc cả hai chuỗi có thể được tách dòng phụ thành một plasmid biểu hiện chứa GS. Ngoài ra, các tỷ lệ khác nhau của chuỗi nút và chuỗi lỗ có thể được kết hợp thành một biểu hiện chứa GS duy nhất nếu cần thay đổi mức biểu hiện tương đối của một trong hai chuỗi. Trình tự cADN mã hóa chuỗi nút hoặc chuỗi lỗ được dung hợp trong khung với trình tự mã hóa của peptit tín hiệu, có thể là trình tự dẫn đầu kappa chuột, để tăng cường tiết sản phẩm mong muốn vào môi trường nuôi cấy tế bào. Sự biểu hiện được điều khiển bằng trình tự khởi động của cytomegalovirus (cytomegalovirus - CMV) của virus.

Các tế bào CHO GSKO có thể được chuyển nhiễm tạm thời hoặc ổn định. Để chuyển nhiễm ổn định, các tế bào CHO GSKO được chuyển nhiễm bằng cách sử dụng

phương pháp điện phân và lượng plasmid biểu hiện chuỗi lỗ và chuỗi nút tái tổ hợp thích hợp, và các tế bào đã chuyển nhiễm được duy trì trong môi trường nuôi cấy huyền phù, ở mật độ tế bào thích hợp. Việc lựa chọn các tế bào được chuyển nhiễm được thực hiện bằng cách phát triển trong môi trường không có huyết thanh chứa 25 μ M methionin sulfoximin (MSX), không có glutamin, và được ủ ở 32-37°C và 5-7% CO₂. Thể dung hợp Fc được tiết vào môi trường từ các tế bào CHO.

Protein được tinh chế bằng cách sử dụng: (1) Sắc ký ái lực protein A, tiếp theo là sắc ký trao đổi cation hoặc sắc ký tương tác kỵ nước (hoặc các phương pháp thích hợp khác); hoặc (2) sắc ký đa phương thức sau đó là sắc ký tương tác kỵ nước (hoặc các phương pháp thích hợp khác).

Để tinh chế bắt đầu bằng sắc ký protein A, các protein từ môi trường thu gom được bắt giữ trên nhựa MabSelect SuRe Protein A (GE Healthcare). Sau đó, nhựa được rửa nhanh bằng dung dịch đệm chạy, như dung dịch muối đệm phosphat (PBS), độ pH 7,4) hoặc dung dịch đệm chạy chứa Tris, để loại bỏ chất không được gắn kết đặc hiệu. Sau đó, protein được rửa giải khỏi nhựa bằng dung dịch có độ pH thấp, chẳng hạn như axit axetic 20 mM/axit xitric 5 mM. Các phân đoạn chứa thể dung hợp Fc được thu gom. Độ pH có thể được tăng lên khi cần bằng cách thêm bazơ như Tris 0,1 M, pH 8,0. Ở giai đoạn này, thể dung hợp Fc có thể được sử dụng để sàng lọc liên kết/hoạt tính, hoặc nếu muốn, có thể được tinh chế thêm bằng sắc ký tương tác kỵ nước sử dụng nhựa như Phenyl Sepharose HP. Thể dung hợp Fc có thể được rửa giải từ cột Phenyl Sepharose HP bằng cách sử dụng gradien từ 500 mM đến 0 mM của natri sulfat trong natri phosphat 10 mM, pH 7 trên 10 thể tích cột. Thể dung hợp Fc có thể được tinh chế thêm bằng sắc ký loại trừ kích thước bằng cách sử dụng cột Superdex 200 (GE Healthcare) với sự rửa giải đẳng dòng trong PBS, pH 7,4 hoặc đệm được trao đổi thành đệm mong muốn. Ví dụ 1-8 và 10 được tinh chế theo cách này.

Để tinh chế bắt đầu bằng sắc ký đa phương thức, các protein từ môi trường thu gom được bắt giữ trên nhựa CantoMMC (GE Healthcare). Sau đó, nhựa được rửa nhanh bằng 100 mM xitrat, pH 5,0 (đệm “A”) trước khi rửa 80%/20% dung dịch đệm “A” và 25 mM natri phosphat, 1 M natri clorua, pH 7,5 (đệm “B”). Protein mong muốn sau đó được rửa giải từ nhựa ở 70% đệm “B”. Thể dung hợp Fc có thể được tinh chế thêm bằng sắc ký tương tác kỵ nước sử dụng nhựa như Phenyl Sepharose HP (GE Healthcare). Thể

dung hợp Fc có thể được rửa giải từ cột Phenyl Sepharose HP bằng cách sử dụng gradien tuyến tính từ 800 mM đến 0 mM của natri sulfat trong Tris 20 mM, pH 8. Thể dung hợp Fc có thể được tinh chế thêm bằng sắc ký trao đổi ion bằng cách sử dụng cột Q Sepharose (GE Healthcare). Th thể dung hợp Fc có thể được rửa giải từ cột bằng cách sử dụng gradien natri clorua 0 M đến 1 M trong Tris 20 mM, pH 8. Các phân đoạn được thu gom và dung dịch đậm được trao đổi thành dung dịch đậm mong muốn để bảo quản. Ví dụ 11 được tinh chế theo cách này.

Tổng hợp hóa học

Các hợp chất NRG4 theo sáng chế là các peptit không bao gồm các vùng Fc của IgG (ví dụ, Ví dụ 9 trong Bảng 2 nêu trên) cũng có thể được tạo ra bằng cách tổng hợp peptit pha rắn sử dụng chiến lược Fmoc/t-Bu. Các peptit được tổng hợp trên máy tổng hợp peptit tự động SymphonyX (PTI Protein Technologies Inc.).

Nhựa Fmoc-L-Leu-Wang (0,3-0,8 mmol/gam, cỡ lưới 200-400 mesh, Chem-Impex) được sử dụng để tổng hợp peptit. Việc khử bảo vệ bằng Fmoc được thực hiện bằng cách sử dụng dung dịch piperidin 20% thể tích/thể tích trong DMF. Liên kết axit amin được thực hiện bằng cách sử dụng 10 đương lượng Fmoc-axit amin, 0,9 M diisopropylcarbodiimide (DIC) và 0,9 M Oxyma (tỷ lệ mol 1:1:1) trong DMF trong 2 giờ ở 25°C. Các bước rửa được thực hiện với DMF và được bao gồm sau mỗi bước liên kết và khử bảo vệ. Chi tiết bổ sung được cung cấp dưới đây trong Bảng 3.

Bước	Dung môi/vận hành	Thời gian trộn	Số lần lặp lại
1	DMF	12:01:00 SA	2
2	Piperidin 25%/DMF	12:10:00 SA	3
3	DMF	12:01:00 SA	1
4	DMF	12:01:00 SA	5
5	Metylen Clorua	12:01:00 SA	1
6	Metylen Clorua	12:00:02 SA	1
7	Chất phản ứng (axit amin)	12:00:01 SA	1
8	0,9 M Oxyma trong DMF	12:00:01 SA	1
9	0,9 M DIC trong DCM	3:00:00 SA	1
10	DMF	12:01:00 SA	3

Bảng 3. Quy trình liên kết và khử bảo vệ bằng Fmoc.

Tất cả các axit amin được sử dụng trong trình tự chính là axit amin L: 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.

Sau khi kết thúc quá trình kéo dài peptit-nhựa được mô tả nêu trên, nhóm Fmoc cuối cùng được loại bỏ và nhựa được rửa bằng metylen clorua trước khi phân giải các peptit. 1,5 mL dung dịch nước, triisopropylsilan, thioanisol, 1,2 etandithiol (1:1:1) được thêm vào 13 mL axit trifloaxetic (TFA) và hỗn hợp phân giải thu được được thêm vào nhựa và trộn trong 2,5 giờ trong xi lanh phản ứng. Dung dịch TFA chứa peptit đã phân cắt được chuyển vào lọ hình nón 50 mL có chứa dietyl ete lạnh. Dung dịch peptit kết tủa được kéo thành viên dày và ete được gạn. Quá trình kết tủa ete được lặp lại hai lần để rửa hỗn hợp còn sót lại trước khi tiến hành tái gấp nếp.

Peptit thô được hòa tan trong nước và thêm axetonitril nếu cần. Nồng độ peptit thô được điều chỉnh thành 2,5-3 mg/mL (200 mL) trong axetonitril và nước. Sau đó, mẫu được tái gấp nếp ngay. Dung dịch đệm tái gấp nếp được chuẩn bị bằng cách thêm glutathion oxy hóa và glutathion khử theo tỷ lệ, GSSG:GSH (2 mM:1 mM) trong dung dịch đệm tris 0,1 M, pH 8. Dung dịch peptit thô được thêm vào dung dịch đệm tái gấp nếp đến nồng độ 0,13-0,15 mg/mL (pha loãng 20 lần) và hỗn hợp tái gấp nếp được giữ ở 4°C mà không cần khuấy. Sau 1 ngày, hỗn hợp tái gấp nếp được làm dừng bằng cách thêm TFA lên đến 0,2% để đưa độ pH về 3,0. Dung dịch làm dừng sau đó được lọc và tinh chế.

Dung dịch peptit được nạp vào cột HPLC và sau đó được cân bằng với dung dịch đệm A trước khi kích hoạt gradien. Dung dịch đệm A: 0,1% TFA trong nước; Dung dịch đệm B: 100% axetonitril. Gradien: 10% B đến 25% B trong 100 phút. Lưu lượng: 18 mL/phút; phát hiện ở bước sóng 220 nm (Máy dò Waters 2489). Cột: Cột Waters Symmetry Prep C18, 7µm, 19x300mm (Waters Part # WAT066245). Các phân đoạn được kích hoạt tự động bởi UV và được thu gom bằng Waters Fraction Collector III.

Các phân đoạn thu gom có chứa peptit mong muốn được kết hợp và làm đông khô nhanh.

Các thử nghiệm in vitro

Thử nghiệm liên kết HER4/NRG-Fc để sàng lọc các biến thể NRG4 để cải thiện liên kết

Thử nghiệm liên kết được sử dụng để thực hiện sàng lọc thông lượng cao của các protein dung hợp Fc biến thể NRG4 với thụ thể HER4, để xác định các biến thể định hướng ái lực có khả năng tăng hoạt hóa và tín hiệu của thụ thể. Các đĩa ELISA được phủ một kháng thể kháng thể His ở 2 μ g/ml trong PBS để tạo điều kiện thuận lợi cho việc bắt giữ chuẩn hóa cấu trúc vùng ngoại bào của thụ thể HER4 được gắn thể His ở đầu C (ECD) sau khi phong bế đĩa bằng 1% BSA/PBS/0,1% Tween 20 (HER4 ECD ở 5 μ g/ml). Một lượng bão hòa của các biến thể NRG4-Fc chưa tinh chế trong môi trường biểu hiện (Bắt đầu từ 10 μ g/ml với các dung dịch pha loãng nối tiếp trong 1% BSA/PBS/0,1% Tween 20) được ủ với thụ thể được bắt giữ trong 1 giờ. Sau khi rửa, biến thể liên kết NRG4-Fc được phát hiện bằng phương pháp so màu với thuốc thử phát hiện thứ cấp phosphatase kiềm đặc hiệu kháng Fc người để định lượng liên kết. Thời gian ủ biến thể liên kết với thụ thể hoặc thời lượng của các bước rửa tiếp theo là khác nhau để xác định rõ hơn các biến thể liên kết được điều khiển bởi tỷ lệ ái lực và tỷ lệ tắt, tương ứng. Quá trình sàng lọc này xác định việc cải biến D1G, như được nêu trong Ví dụ 1, là có ái lực cao và có khả năng làm tăng sự hoạt hóa và truyền tín hiệu của thụ thể, như được chỉ ra trong dữ liệu dưới đây trong Bảng 4.

Liều dùng #	Ví dụ 1		WT NRG1		WT NRG4	
	liều (μ g/mL)	O.D. 405	liều (μ g/mL)	O.D. 405	liều (μ g/mL)	O.D. 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

Bảng 4. Liên kết với miền ngoại bào HER4.

Như đã thấy trong Bảng 4, Ví dụ 1, bao gồm sự cải biến D1G, có liên kết HER4 tương tự với WT NRG1 ở liều tương tự và liên kết với HER4 lớn hơn đáng kể so với WT NRG4 ở liều tương tự trong nghiên cứu này.

Tạo dòng tế bào HER2-4 và HER2-3 chuột và CHO người

Thử nghiệm dựa trên tế bào sử dụng các tế bào CHO-K1 biểu hiện quá mức các thụ thể HER của người hoặc chuột được sử dụng để xác định hoạt tính của các hợp chất NRG4. Tế bào CHO-K1 (ATCC) được nuôi trong DMEM-F12 3:1 với 5% FBS với 20mM HEPES, 40µg/mL L-Prolin, 1x kháng sinh và được phân tách 1: 5 cứ 2-3 ngày một lần với TripLE Express (Gibco) . Tế bào được chuyển nhiễm bằng ADN plasmid mã hóa thụ thể HER theo cặp (hHER2-3, hHER2-4, rHER2-3 và rHER2-4) với Fugene 6 (Promega) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. HER2 được bao gồm, bởi vì thụ thể này không liên kết phối tử nhưng là đối tác dime hóa được ưu tiên của các thụ thể HER đối với truyền tín hiệu xuôi dòng. Các tế bào đã chuyển nhiễm được chọn lọc bằng Puromycin (12 µg/ml) và Hygromycin (1 mg/ml) trong 3-4 tuần và các dòng vô tính thu được bằng cách tách dòng pha loãng hạn chế vào đĩa 96 lỗ. Các dòng vô tính được chọn lọc bằng sự biểu hiện gen thích hợp của HER2, HER3 hoặc HER4 bằng phương pháp Taqman. Các dòng có biểu hiện thụ thể thích hợp được xác nhận bằng đáp ứng phospho-ERK 1/2 cảm ứng bởi NRG1. Các dòng vô tính được lớn lên, thu gom, tạo phân ước vào các ống lạnh khô thành các thùng đông lạnh và sau đó được đông lạnh trong nitơ lỏng để bảo quản lâu dài.

Sàng lọc các phân tử bằng phosphoryl hóa ERK 1/2 in vitro qua trung gian HER2-HER4 của người

Thử nghiệm hoạt tính phospho-ERK1/2 được sử dụng để xác định hiệu lực của các hợp chất NRG4. Hiệu lực của Ví dụ 1-8 và 10 so với NRG1 của người WT và/hoặc NRG4 của người được phân tích trong các nghiên cứu đo lường sự kích thích của quá trình phosphoryl hóa ERK 1/2 qua trung gian HER2-HER4 của người. Thử nghiệm này bao gồm dòng ổn định CHO-K1 biểu hiện HER2 và HER4 của người. Tế bào CHO-hHER2-hHER4 (dòng 1H6) được nuôi cấy thường xuyên trong DMEM: F12(3:1), 5% FBS, 40 µg/mL L-Prolin, 10 µg/mL puromycin và 1mg/mL hygromycin ở 37°C, 5% CO₂. Tế bào được rửa hai lần với 1X PBS, phân ly bằng 0,05% trypsin/0,53µM EDTA và được thu gom bằng cách ly tâm ở 300xg trong 10m. Tế bào được tạo huyền phù lại trong môi trường duy trì. 20.000 tế bào/lỗ, trong 30µL, được cấy vào các đĩa nuôi cấy tế bào Poly-D-Lysin 384 lỗ (Greiner, Cat No. 781946). Các đĩa được đậy bằng nắp của nhà sản xuất và được chuyển đến tủ ẩm nuôi cấy mô 37°C ở 5% CO₂, độ ẩm 80%+ và

được để cho bám dính. Sau 24 giờ, môi trường được lấy ra khỏi đĩa và được thay thế bằng 30 μ L môi trường không có huyết thanh (DMEM glucoza thấp với 0,1% BSA) bằng cách sử dụng bộ xử lý lỏng Biomek FX. Đĩa được đưa về tủ ẩm trong 24h.

Các biến thể hFcNRG4, được biểu thị thoáng qua dưới dạng dịch nổi trên bề mặt 293F, được chuẩn bị trong môi trường đôi trong đĩa 384W trong (Greiner, cat no. 781185) dưới dạng pha loãng nối tiếp 4pt 1:8 (khoảng liều trung bình từ 250pM đến 140000 pM). Môi trường được lấy ra khỏi đĩa nuôi cấy tế bào và 30uL/lỗ biến thể được chuẩn bị được đánh dấu trong các đĩa bằng cách sử dụng bộ xử lý chất lỏng Biomek FX. Các đĩa được niêm phong bằng giấy bạc và được kích thích trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng trên máy lắc quỹ đạo. Tế bào sau đó được rửa một lần với 50uL PBS lạnh. 30uL dung dịch đệm phân giải được thêm vào các tế bào và dao động trong 10m tại RT trên máy lắc quỹ đạo.

Việc phát hiện phosphoryl hóa ERK 1/2 được thực hiện với bộ kit AlphaScreen SureFire phospho-ERK1/2 (T202/Y204) (Perkin Elmer, catalog no. TGRES) hoặc kit thử nghiệm AlphaLISA® SureFire® Ultra™ p ERK1/2 cùng nhau với kit phát hiện IgG AlphaScreen Protein A (Protein-A) (PerkinElmer, catalogue no. 6760617). Sau khi phân giải tế bào CHO-K1, 4 μ L dịch phân giải được chuyển sang Alpha Proxiplate 384W (Perkin Elmer, cat no. 6008280) với 384W Biomek FX. 4uL dịch phân giải dương tính và âm tính 4uL (Perkin Elmer, TGRES-L) được thêm vào các lỗ có sẵn làm mẫu đối chứng. Hỗn hợp chất nhận 5uL/lỗ (chứa kháng thể kháng phoso-Thr202/Tyr204 và hạt chất nhận liên hợp Protein A) được thêm vào đĩa cùng với Forumatrix Mantis. Đĩa được niêm phong, ly tâm nhẹ xuống 1 phút ở 300xg và ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng trên máy lắc quỹ đạo. Hỗn hợp chất cho 2 μ L/lỗ (chứa các hạt chất cho được phủ strepavidin và các kháng thể được biotin hóa đối với epitop ERK1/2 ở xa) được phân phối bởi Mantis. Đĩa được niêm phong, ly tâm nhẹ xuống 1 phút ở 300xg và ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng trên máy lắc quỹ đạo trước khi đọc trên Perkin Elmer Envision 2103 Multilabel Reader (HTS Alpha mode, thời gian kích thích: 40ms, tổng thời gian đo: 130ms).

Mỗi mẫu được lập biểu đồ dựa trên đáp ứng liều hFcNRG4 gốc, được đưa vào mỗi đĩa trong bản sao trong XLFit. Dữ liệu này được vẽ trong GraphPad Prism với thuật

toán bốn tham số và các giá trị hiệu lực EC50 được trích xuất. Kết quả được đưa ra trong các Bảng 5 và 6.

Mẫu	EC50 (nM)
WT NRG4	2,53
Ví dụ 1	$0,77 \pm 0,16$
Ví dụ 2	$2,77 \pm 0,39$
Ví dụ 3	$0,29 \pm 0,01$
Ví dụ 4	$0,53 \pm 0,05$
Ví dụ 5	$0,84 \pm 0,27$

Bảng 5. Hoạt tính của các ví dụ 1-5 so với WT NRG4. Dữ liệu cho Ví dụ 1-5 đại diện cho trung bình của hai lần lặp lại với độ lệch chuẩn được chỉ ra.

Như đã thấy trong dữ liệu ở Bảng 5, phù hợp với việc tăng ái lực của nó với HER4, trong nghiên cứu này, việc cải biến D1G cũng làm tăng đáng kể hoạt tính ở HER4 và HER2 so với NRG4 kiểu dại, bao gồm trong các ví dụ bao gồm các cải biến axit amin bổ sung.

Mẫu	EC50 (nM)
WT NRG1	0,3192
WT NRG4	1,2980
Ví dụ 6	0,3947
Ví dụ 7	0,5629
Ví dụ 8	0,4033
Ví dụ 10	0,2448

Bảng 6. Hoạt tính của Ví dụ 6-8 và 10 so với WT NRG1 và NRG4.

Như đã thấy trong dữ liệu ở Bảng 6, trong nghiên cứu này Ví dụ 6-8 và 10, mỗi ví dụ bao gồm sự cải biến D1G và các cải biến bổ sung, cho thấy hoạt tính tăng ở HER4 và HER2 so với WT NRG4 và hoạt tính tương tự so với WT NRG1.

Thử nghiệm HER2-4 hoặc HER2-3 phospho-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) của người và chuột để kiểm tra các protein tinh khiết

Thử nghiệm hoạt tính phospho-ERK1/2 được sử dụng với các tế bào CHO-K1 biểu hiện quá mức các thụ thể HER của người hoặc chuột để xác định hiệu lực và tính chọn lọc của các hợp chất NRG4 tinh khiết. Các dòng tế bào CHO-K1 biểu hiện thụ thể HER của người hoặc chuột được nuôi cấy với môi trường chọn lọc (DMEM-F12 3:1 với 5% FBS với 20mM HEPES, 40µg/mL L-Prolin, 1x kháng sinh, 12µg/mL puromycin, 1mg/mL Hygromycin B). Vào ngày -1 (ngày trước khi thử nghiệm phospho-ERK1/2),

tế bào được rửa một lần bằng PBS, tách ra bằng dung dịch phân ly tế bào không có enzym (GIBCO cat # 13151-014), và tạo huyền phù lại trong môi trường gieo cấy (DMEM-F12 3:1 với 20mM HEPES, 1x kháng sinh, 0,2% FBS). Các tế bào được gieo trong đĩa phủ Poly-D-Lysin 96 lỗ (BD cat # 354640) với tốc độ 10.000 tế bào trên 0,1mL trên mỗi lỗ. Tế bào được nuôi cấy trong tủ ẩm nuôi cấy mô ở 37°C 5% CO₂ qua đêm. Vào ngày 1 (ngày thử nghiệm pERK1/2), các đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Môi trường nuôi cấy được loại bỏ, sau đó bổ sung 50µL phối tử ở các nồng độ khác nhau được pha loãng trong PBS-20mM HEPES-0,005% BSA. Các peptit NRG1 và NRG4 tự nhiên của người được mua từ ReproKine (Tampa, FL). Thời gian kích thích là 30 phút (trừ dòng hHER2-4 1H6 trong đó 15 phút được sử dụng để kích thích). Khi kết thúc kích thích, các phối tử được loại bỏ và 70µL dung dịch đệm phân giải (được tạo ra theo công thức của nhà sản xuất, Perkin Elmer cat# ALSU-PERK-A10K) được thêm vào. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút trên máy lắc đĩa với tốc độ khuấy 350 vòng/phút, sau đó trên băng trong 1 giờ mà không lắc. 30µL dịch phân giải tế bào được chuyển sang Optiplate trắng 96 lỗ (Perkin Elmer cat# 6002290) để thử nghiệm phospho-ERK1/2. Tóm tắt, 7,5µL hạt nhận được thêm vào 30µL dịch phân giải trong Optiplate. Đĩa được phủ bằng lá nhôm và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ trên máy lắc đĩa với tốc độ khuấy 350 vòng/phút. Sau đó, 7,5µL hạt cho được thêm vào và đĩa được phủ bằng lá nhôm và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ trên máy lắc đĩa với tốc độ 350 vòng/phút hoặc ở 4°C qua đêm (làm ấm đĩa ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ trước khi đọc). Dữ liệu tín hiệu alpha thu được trên thiết bị Envision (đầu đọc đĩa tương thích với công nghệ Alpha). Hạt cho và hạt nhận được tạo ra theo quy trình thử nghiệm. Dữ liệu hiển thị được tạo ra bằng kit thử nghiệm AlphaScreen SureFire p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (Cat # TGRES50k) hoặc kit thử nghiệm AlphaLISA® SureFire® Ultra™ p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) (Perkin Elmer cat# ALSU-PERK-A10K). Hoạt tính của peptit NRG1 là tương tự nhau trong cả hai loại thử nghiệm. Dữ liệu thô thu được từ công cụ Envision được nhập vào phần mềm GraphPad Prism (phiên bản 7). Giá trị EC₅₀ được tạo ra bởi một đường cong đáp ứng liều bốn tham số độ dốc thay đổi. % dữ liệu hoạt tính NRG1 tối đa được tạo ra bằng cách biểu thị dữ liệu thô tối đa trung bình cho hợp chất NRG4 trên dữ liệu thô tối đa trung bình cho NRG1 tự nhiên

của người trên mỗi đĩa và nhân với 100. Dữ liệu được cung cấp dưới đây trong Bảng 7-

9. Giá trị N phản ánh số lần chạy thử nghiệm độc lập.

Mẫu	EC50 (nM)	% hoạt tính NRG1 tối đa
WT NRG1	$0,67 \pm 0,07$ (N=9)	100
WT NRG4	$90,09 \pm 33,21$ (N=8)	75 ± 4 (N=8)
Ví dụ 9	$0,20 \pm 0,01$ (N=11)	91 ± 3 (N=11)
Ví dụ 10	$0,16 \pm 0,02$ (N=8)	82 ± 4 (N=8)
Ví dụ 11	$0,55 \pm 0,11$ (N=5)	79 ± 2 (N=5)

Bảng 7. Thử nghiệm HER2/HER4 người.

Mẫu	EC50 (nM)	% hoạt tính NRG1 tối đa
WT NRG1	$0,29 \pm 0,05$ (N=4)	100
Ví dụ 9	$0,17 \pm 0,02$ (N=4)	87 ± 4 (N=4)
Ví dụ 10	$0,12 \pm 0,04$ (N=2)	88 ± 7 (N=2)
Ví dụ 11	$0,17 \pm 0,06$ (N=2)	96 ± 2 (N=2)

Bảng 8. Thử nghiệm HER2/HER4 chuột.

Như đã thấy trong Bảng 7, peptit NRG1 kiểu đại của người biểu hiện hoạt tính hữu hiệu tại các thụ thể HER4 và HER2 của người trong khi peptit NRG4 kiểu đại của người hoạt động như chất chủ vận từng phần yếu. Ví dụ 9-11 thể hiện hoạt tính hữu hiệu với giá trị EC50 mạnh hơn một chút so với NRG1 kiểu đại của người và % hoạt tính tối đa lớn hơn peptit NRG4 kiểu đại của người và gần bằng với NRG1 của người. Như đã thấy trong Bảng 8, các kết quả tương tự cũng thu được ở các thụ thể HER4 HER2 của chuột với hiệu lực tăng nhẹ so với NRG1 của người và hoạt tính tối đa gần với NRG1 của người. Kết luận, các ví dụ về các hợp chất NRG4 thể hiện hoạt tính phospho-ERK1/2 lớn hơn ở cả thụ thể HER4 HER2 của người và chuột so với NRG4 tự nhiên của người và gần với NRG1 tự nhiên của người.

	Thử nghiệm HER2/HER3 người	Thử nghiệm HER2/HER3 chuột
Mẫu	EC50 (nM)	EC50 (nM)
WT NRG1	$0,83 \pm 0,20$ (N=6)	32 ± 14 (N=2)
WT NRG4	Không có hoạt tính lên đến 1000 nM (N=1)	nd
Ví dụ 9	Không có hoạt tính lên đến 3000 nM (N=6)	Không có hoạt tính lên đến 3000 nM (N=4)
Ví dụ 10	Không có hoạt tính lên đến 1000 nM (N=3)	Không có hoạt tính lên đến 100 nM (N=2)
Ví dụ 11	Không có hoạt tính lên đến 1000 nM (N=1)	Không có hoạt tính lên đến 1000 nM (N=2)

Bảng 9. Thử nghiệm HER2/HER3 người và chuột

Như đã thấy trong Bảng 9, peptit NRG1 kiểu đại của người biểu hiện hoạt tính hữu hiệu tại các thụ thể HER3 HER2 của người trong khi peptit NRG4 kiểu đại của người và tất cả các Ví dụ cho thấy không có hoạt tính nào tại cặp thụ thể này thể hiện tính chọn lọc khác biệt đối với cặp thụ thể HER4 HER2. Kết luận, các ví dụ về hợp chất NRG4 chứng minh không có hoạt tính phospho-ERK1/2 tại các thụ thể HER3 HER2, do đó cho thấy sự duy trì tính chọn lọc thụ thể HER4 và HER2 của peptit NRG4 kiểu đại.

Nghiên cứu *in vivo*

Ảnh hưởng của ví dụ 9 đến chức năng và cấu trúc tim trong mô hình MI ở chuột

Hai nghiên cứu được lý về hiệu quả phi lâm sàng được thực hiện trên mô hình chuột bị suy tim có giảm phân suất tổng máu (HFrEF) để nghiên cứu nồng độ trong huyết tương và thời gian tiếp xúc với Ví dụ 9. Cả hai nghiên cứu đều đo lường tác động lên chức năng và cấu trúc tim ở chuột Sprague Dawley đực bị nhồi máu cơ tim do phẫu thuật.

Các phương pháp luận tương tự được sử dụng cho cả hai nghiên cứu. Những con chuột đực Sprague Dawley bị nhồi máu cơ tim do phẫu thuật được mua và gây mê và thông khí tích cực trong suốt quy trình. Một đường rạch được thực hiện giữa xương sườn thứ tư và thứ năm, để lộ tim. Động mạch vành trái bị thắt vĩnh viễn. Các động vật được phẫu thuật giả cũng trải qua quy trình tương tự ngoại trừ việc chỉ khâu lại được đặt xung quanh động mạch vành trái mà không bị buộc. Tất cả những con chuột được nuôi riêng trong một căn phòng được kiểm soát nhiệt độ và độ ẩm và được duy trì theo chu kỳ sáng/tối 12 giờ. Hai đến ba tuần sau khi phẫu thuật, chuột được siêu âm tim qua lồng ngực để xác định phân suất tổng máu (% EF) và kích thước tâm thất trái (LVD) bằng hệ thống siêu âm Vevo 2100. Chuột được phân ngẫu nhiên giữa các nhóm điều trị theo % EF và LVD.

Các phép đo % EF và LVD được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn (SE). Phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm JMP® 13 (SAS Institute, Inc.; Cary, NC) và kiểm định Dunnett được sử dụng để so sánh thống kê giữa các nhóm điều trị. Ý nghĩa thống kê được chấp nhận ở mức $P < 0,05$.

Mô hình thử nghiệm để xác định nồng độ huyết tương của ví dụ 9 cho hiệu quả phi lâm sàng. Với tốc độ truyền 10 μ l/h, Ví dụ 9 hoặc chất dẫn (1X nước muối đậm

phosphat của Dulbecco [DPBS]) được tiêm dưới da (SC) liên tục trong 4 ngày thông qua bơm Alzet® (Model 2ML1; bơm thẩm thấu Alzet®; Cupertino, CA). Các mức liều được sử dụng cho Ví dụ 9 là 0,22, 0,73, 2,18 và 7,28 mg/kg/ngày bằng cách sử dụng bơm truyền. Vào ngày thứ 4, mẫu máu được thu thập để xác định nồng độ trong huyết tương và bơm truyền được lấy ra. Bảy ngày sau khi bắt đầu dùng thuốc, chức năng tim (% EF) và cấu trúc tim (LVD) được đánh giá cho tất cả các động vật. Mười bốn ngày sau khi bắt đầu dùng thuốc, % EF và LVD được đánh giá cho hai nhóm điều trị bằng chất dẫn và hai nhóm dùng liều cao nhất.

Kết quả: Điều trị bằng hợp chất trong ví dụ 9 cho thấy sự cải thiện chức năng tim phụ thuộc vào liều lượng (% EF) khi sử dụng bơm thẩm thấu trong 96 giờ (Bảng 10). Nhóm liều cao dùng 2,18 và 7,28 mg/kg/ngày, cho thấy chức năng tim được cải thiện trong 2 tuần sau khi bắt đầu truyền (Bảng 10). Các liều này đạt được nồng độ trong huyết tương ở trạng thái ổn định tương ứng là 29,62 và 72,24 nM (Bảng 11). Tất cả các động vật MI được điều trị đều có biểu hiện giãn LVD ít hơn so với nhóm chất dẫn (Bảng 10).

Phân suất tổng máu						
Liều (mg/kg/ngày)	Đường cơ sở		7 ngày sau khi bắt đầu dùng liều		14 ngày sau khi bắt đầu dùng liều	
	Trung bình	Sai số chuẩn	Trung bình	Sai số chuẩn	Trung bình	Sai số chuẩn
Sham, N=3	70,2	6,42	68,1	4,64	ND	ND
Chất dẫn, 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	ND	ND
0,73, N=7	42,3	1,42	45,8	2,09	ND	ND
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
Đường kính tâm thất trái (cuối tâm trương)						
Liều (mg/kg/ngày)	Đường cơ sở		7 ngày sau khi bắt đầu dùng liều		14 ngày sau khi bắt đầu dùng liều	
	Trung bình	Sai số chuẩn	Trung bình	Sai số chuẩn	Trung bình	Sai số chuẩn
Sham, N=3	7,21	0,51	7,49	0,76	ND	ND
Chất dẫn, 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	ND	ND
0,73, N=7	7,55	0,27	7,83	0,30	ND	ND
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

Bảng 10. Ảnh hưởng của việc truyền dịch trong 96 giờ đối với EF trong mô hình HFrEF ở chuột. Các chữ viết tắt: N = số con vật; ND = không xác định; SE = sai số chuẩn. * $p < 0,05$ so với chất dẫn.

Liều (mg/kg/ngày)	Trung bình (nM)	Độ lệch chuẩn
0,22	2,59	0,71
0,73	9,94	1,59
2,18	29,62	4,86
7,28	72,24	13,66

Bảng 11. Phơi nhiễm trong huyết tương chuột sau 96 giờ tiêm truyền.

Mô hình nghiên cứu để xác định thời gian truyền cho hiệu quả phi lâm sàng. Với tốc độ truyền 10 μ l/giờ, 2,18 mg/kg/ngày của Ví dụ 9 hoặc chất dẫn (DPBS) được sử dụng SC trong 48, 72 hoặc 96 giờ thông qua bơm Alzet®. Vào cuối giai đoạn truyền được chỉ định, mẫu máu được thu thập để xác định nồng độ trong huyết tương và bơm truyền được tháo ra. Bảy ngày sau khi bắt đầu dùng thuốc, chức năng tim (% EF) và cấu trúc tim (LVD) được đánh giá cho tất cả các động vật.

Kết quả: Như đã thấy trong Bảng 12, trong nghiên cứu này, việc điều trị bằng hợp chất trong Ví dụ 9 cho thấy sự cải thiện chức năng tim phụ thuộc vào thời gian truyền khi sử dụng bơm Alzet® trong 48 đến 96 giờ. Việc truyền hợp chất trong Ví dụ 9 trong 72 giờ và 96 giờ giúp cải thiện EF đáng kể vào ngày thứ 7 sau khi bắt đầu dùng thuốc. Tất cả các động vật MI được điều trị cho thấy giãn LVD ít hơn so với nhóm chất dẫn.

	Phân suất tổng máu			
	Đường cơ sở		7 ngày sau khi bắt đầu dùng liều	
Khoảng thời gian (giờ)	Trung bình	Sai số chuẩn	Trung bình	Sai số chuẩn
Chất dẫn, 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
	Đường kính tâm thất trái (cuối tâm trương)			
	Đường cơ sở		7 ngày sau khi bắt đầu dùng liều	
Khoảng thời gian (giờ)	Trung bình	Sai số chuẩn	Trung bình	Sai số chuẩn
Chất dẫn, 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

Bảng 12. Ảnh hưởng của việc truyền dịch bằng hợp chất trong ví dụ 9 trong nhiều thời gian đối với chức năng tim. Các chữ viết tắt: N = số con vật; ND = không xác định; SE = sai số chuẩn. * $p < 0,05$ so với chất dẫn.

Thời gian truyền (giờ)	Trung bình (nM)	Độ lệch chuẩn
48	40,13	6,37
72	47,28	17,85
96	31,42	9,86

Bảng 13. Phoi nhiễm trong huyết tương ở mô hình chuột nhồi máu cơ tim sau truyền dịch chứa Ví dụ 9.

Dữ liệu phi lâm sàng cho thấy LVEF được cải thiện trong mô hình chuột HFrEF khi nồng độ trong huyết tương của Ví dụ 9 được duy trì ở 3 đến 100 nM trong thời gian từ 72 đến 96 giờ.

Ảnh hưởng của ví dụ 10 đến chức năng và cấu trúc tim trong mô hình MI ở chuột

Một nghiên cứu được lý về hiệu quả phi lâm sàng được thực hiện trên mô hình chuột bị suy tim có giảm phân suất tổng máu (HFrEF) để đánh giá những thay đổi về chức năng và cấu trúc tim sau khi điều trị bằng captopril, điều trị bằng ví dụ 10 hoặc điều trị kết hợp.

Các phương pháp Những con chuột đực Sprague Dawley bị nhồi máu cơ tim do phẫu thuật được mua và gây mê và thông khí tích cực trong suốt quy trình. Một đường rạch được thực hiện giữa xương sườn thứ tư và thứ năm, để lộ tim. Động mạch vành trái bị thắt vĩnh viễn. Tất cả những con chuột được nuôi riêng trong phòng được kiểm soát nhiệt độ và độ ẩm và được duy trì theo chu kỳ sáng/tối 12 giờ. Hai đến ba tuần sau khi phẫu thuật, chuột được siêu âm tim qua lồng ngực để xác định phân suất tổng máu (% EF) và kích thước tâm thất trái (LVD) bằng hệ thống siêu âm Vevo 2100. Chuột được phân ngẫu nhiên theo các nhóm điều trị theo % EF và LVD.

Các phép đo % EF và LVD được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn (SE). Phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm JMP® 13 (SAS Institute, Inc.; Cary, NC) và kiểm định Dunnett được sử dụng để so sánh thống kê giữa các nhóm điều trị. Ý nghĩa thống kê được chấp nhận ở mức $P < 0,05$.

Mô hình nghiên cứu. Ba tuần sau khi phẫu thuật MI, động vật được chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm điều trị (giả dược hoặc captopril, 2g/L nước uống, tùy thích) theo % EF và LVD. Ba tuần và bốn tuần sau khi bắt đầu dùng thuốc, chức năng tim (% EF) và cấu trúc tim (LVD) được đánh giá bằng siêu âm tim qua lồng ngực. Động vật được ngẫu nhiên hóa tiếp thành các nhóm bổ sung dựa trên chức năng tim (% EF) và cấu trúc tim (LVD) cho các nhóm sau: Giả dược, Ví dụ 10, captopril và Ví dụ 10+captopril. Động vật trong nhóm Ví dụ 10 được tiêm một mũi duy nhất vào tuần thứ 4 sau lần ngẫu nhiên hóa thứ hai. Chức năng tim (% EF) và cấu trúc tim (LVD) được đánh giá vào tuần thứ 5 và thứ 6.

Kết quả: Kết quả được nêu trong bảng 14.

Phân suất tổng máu											
	Đường cơ sở		Tuần 3			Tuần 4		Tuần 5		Tuần 6	
	Trung bình	s.e.	Trung bình	s.e.		Trung bình	s.e.	Trung bình	s.e.	Trung bình	s.e.
Chất dẫn	38,2	1,42	32,8	1,55	Chất dẫn	33,4	2,49	30,0	2,70	29,9	2,43
Captopril	39,1	1,30	38,4	2,43	Captopril	36,1	2,66	36,2	3,23	34,6	3,09
					Ví dụ 10	33,3	2,06	46,5*	3,68	46,0*	2,46
					Ví dụ 10 + Captopril	35,8	1,96	47,3*	1,97	46,7*	2,45
Đường kính tâm thất trái (cuối tâm trương)											
	Đường cơ sở		Tuần 3			Tuần 4		Tuần 5		Tuần 6	
	Trung bình	s.e.	Trung bình	s.e.		Trung bình	s.e.	Trung bình	s.e.	Trung bình	s.e.
Chất dẫn	8,75	0,25	9,00	0,18	Chất dẫn	9,25	0,44	10,16	0,46	9,92	0,40
Captopril	8,66	0,16	8,57	0,14	Captopril	8,64	0,29	8,64*	0,24	8,71*	0,21
					Ví dụ 10	9,33	0,24	9,35	0,37	9,01	0,25
					Ví dụ 10 + Captopril	8,82	0,12	8,51*	0,23	8,41*	0,28

Bảng 14. Ảnh hưởng của captopril, một lần tiêm Ví dụ 10 hoặc liệu pháp phối hợp đối với EF trong mô hình chuột bị suy tim với phân suất tổng máu giảm. Các chữ viết tắt AVG = trung bình. s.e. = sai số chuẩn. * $p < 0,05$ so với chất dẫn.

Như đã thấy trong Bảng 14, trong khi điều trị bằng captopril làm chậm lại sự suy giảm chức năng tim trong suốt 6 tuần điều trị (không có ý nghĩa thống kê), điều trị bằng Ví dụ 10 đã cải thiện đáng kể chức năng tim (% EF) và giảm giãn LV sau một lần điều trị.

Ảnh hưởng của ví dụ 11 đến chức năng và cấu trúc tim trong mô hình MI ở chuột

Nghiên cứu được lý về hiệu quả phi lâm sàng được thực hiện trên mô hình chuột bị suy tim có giảm phân suất tổng máu (HFrEF) để xác định mối quan hệ giữa liều và đáp ứng cho Ví dụ 11.

Phương pháp. Những con chuột đực Sprague Dawley bị nhồi máu cơ tim do phẫu thuật được mua từ Charles River. Tóm lại, những con chuột được gây mê và thông khí tích cực trong suốt quy trình. Một đường rạch được thực hiện giữa xương sườn thứ tư và thứ năm, để lộ tim. Động mạch vành trái bị thắt vĩnh viễn. Các động vật được phẫu thuật giả cũng trải qua quy trình tương tự ngoại trừ việc chỉ khâu lùa được đặt xung quanh động mạch vành trái mà không bị buộc. Tất cả những con chuột được nuôi riêng trong phòng được kiểm soát nhiệt độ và độ ẩm và được duy trì theo chu kỳ sáng/tối 12 giờ. Ba tuần sau khi phẫu thuật, chuột được siêu âm tim qua lồng ngực để xác định phân suất tổng máu (% EF) và kích thước tâm thất trái (LVD) bằng hệ thống siêu âm Vevo 2100. Chuột được phân ngẫu nhiên theo các nhóm điều trị theo % EF và LVD.

Các phép đo % EF và LVD được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ sai số chuẩn (SE). Phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm JMP® 13 (SAS Institute, Inc.; Cary, NC) và kiểm định Dunnett được sử dụng để so sánh thống kê giữa các nhóm điều trị. Ý nghĩa thống kê được chấp nhận ở mức $P < 0,05$.

Thiết kế nghiên cứu. Hai đến ba tuần sau khi phẫu thuật MI, động vật được phân bổ vào các nhóm điều trị và được điều trị bằng một mũi tiêm chất dẫn (DPBS) hoặc một trong 3 mức liều (0,3, 1, 3 mg/kg) của Ví dụ 11. Bảy ngày, 14 ngày và 21 ngày sau khi dùng thuốc, chức năng tim (% EF) và cấu trúc tim (LVD) được đánh giá cho tất cả các động vật.

Kết quả: Kết quả được nêu trong bảng 15.

	Phân suất tổng máu							
	Đường cơ sở		7 ngày sau khi dùng liều		14 ngày sau khi dùng liều		21 ngày sau khi dùng liều	
Liều dùng	Trung bình	Sai số chuẩn	Trung bình	Sai số chuẩn	Trung bình	Sai số chuẩn	Trung bình	Sai số chuẩn
Sham, N=5	73,7	2,24	72,5	1,76	71,8	0,81	71,9	3,60
Chất dẫn, N=8	45,0	1,50	41,2	2,90	38,4	1,98	37,8	1,98
0,3 mg/kg, N=8	45,4	2,46	50,1*	3,22	42,6	1,43	36,4	1,43
1 mg/kg, N=8	46,6	1,86	52,4*	2,61	42,2	2,77	39,7	2,77
3 mg/kg, N=8	45,8	1,48	54,7*	2,11	54,0*	2,49	39,6	2,49

Bảng 15. Ảnh hưởng của ví dụ 11 đối với EF trong mô hình suy tim ở chuột cống có phân suất tổng máu giảm. Các chữ viết tắt: N = số con vật; s.e. = sai số chuẩn. * $p < 0,05$ so với chất dẫn.

Như đã thấy trong Bảng 15, điều trị bằng ví dụ 11 cho thấy sự cải thiện chức năng tim phụ thuộc vào liều lượng (% EF). Nhóm dùng liều cao cho thấy chức năng tim được cải thiện trong 2 tuần sau điều trị. Không có sự khác biệt về sự giãn LVD được quan sát thấy giữa các nhóm trong suốt quá trình nghiên cứu (dữ liệu không được hiển thị).

Ảnh hưởng của Ví dụ 9-11 đối với độc tính trên tim

Các nghiên cứu về độc tính học được thực hiện trên Ví dụ 9-11 ở chuột và/hoặc khỉ cynomolgus. Ví dụ 10 được dùng cho chuột trong một lần tiêm SC duy nhất là 0,3 mg/kg, dẫn đến nồng độ thuốc trong huyết tương có thể phát hiện được trong hơn 168 giờ. Chuột bị giết, và việc kiểm tra mô cho thấy tim bị thoái hóa và hoại tử. Ví dụ 11 được sử dụng cho chuột trong một lần tiêm SC duy nhất là 30 mg/kg; nồng độ trong huyết tương không thể phát hiện ở thời điểm 96 giờ. Chuột bị giết, và việc kiểm tra mô không cho thấy bằng chứng nào về sự thoái hóa và/hoặc hoại tử của tim. Ví dụ 11 được dùng một liều duy nhất 3 mg/kg cho khỉ đực và khỉ cái bằng cách tiêm liều lớn SC. Trái ngược với dược động học của nó ở chuột, những mũi tiêm đơn lẻ ở khỉ dẫn đến nồng độ thuốc trong huyết tương có thể phát hiện được, mất hơn 168 giờ để được đào thải. Những con khỉ bị giết, và việc kiểm tra mô cho thấy tim bị thoái hóa và hoại tử. Ví dụ 9, cho thấy thời gian bán hủy sau khi tiêm SC dưới một giờ ở chuột, được dùng với liều lượng dẫn đến nồng độ trong huyết tương dao động từ 3-300 nM trong 96-168 giờ bằng bơm cấy dưới da (SC). Chuột bị giết, và việc kiểm tra mô không cho thấy bằng chứng nào về sự thoái hóa và/hoặc hoại tử của tim. Ví dụ 9, có thời gian bán hủy sau khi tiêm SC dưới 5 giờ ở khỉ, được sử dụng với liều lượng dẫn đến nồng độ trong huyết tương dao động

từ 30-1000 nM trong 96 giờ đối với khỉ đực và khỉ cái bằng cách phẫu thuật đặt ống thông SC hoặc trong tĩnh mạch (IV). Những con khỉ bị giết, và việc kiểm tra mô không cho thấy bằng chứng nào về độc tính và/hoặc hoại tử trên tim. Những dữ liệu này chỉ ra rằng các hợp chất NRG4 có thể được sử dụng mà không gây độc cho tim bằng cách giới hạn thời gian tiếp xúc với hợp chất NRG4.

Trình tự**SEQ ID NO:1 – NRG4 người**

DHEEPCGPSH KSFCLNGGLC YVIPTIPSPF CRCVENYTGA RCEEVFL

SEQ ID NO:2 – hợp chất NRG4

X₀GHEEPCGX₈SHKSFCLNGGLCYX₂₂IPTX₂₆PSPFCRCVX₃₅NYTGARCEX₄₄VFL

trong đó:

X₀ được chọn từ nhóm gồm T, PT, MPT, S, GS, GGS, GGGs, và (GGGGX_λ)_n trong đó X_λ là Q, A, E hoặc S và n=1-5 (SEQ ID NO:5), hoặc không có mặt;

X₈ là E hoặc P;

X₂₂ là Q hoặc V;

X₂₆ là F hoặc I;

X₃₅ là E hoặc A; và

X₄₄ là H, K hoặc E.

SEQ ID NO:3 trình tự đầy đủ của NRG4 người như được biểu hiện

MPTDHEEPCG PSHKSFCLNG GLCYVIPTIP SPFCRCVENY TGARCEEVFL
PGSSIQTksn LFEAFVALAV LVTLIIGAFY FLCRKGFHQR ASSVQYDINL
VETSSTSAHH SHEQH

SEQ ID NO:4 – hợp chất NRG4

GHEEPCGPSH KSFCLNGGLC YQIPTIPSPF CRCVENYTGA RCEKVFL

SEQ ID NO:5 – peptit hoặc trình tự liên kết giàu glyxin

(GGGGX_λ)_n

trong đó:

X_λ là Q, A, E hoặc S; và

n là 1-5.

SEQ ID NO:6 – vùng Fc của IgG

ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTQVHQLDNLGKEYKCKVSNKGLP
APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPG

SEQ ID NO:7 – vùng Fc của IgG

ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTVDHQLDNLNGKEYKCKVSNKGLP
 APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFLLVSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNA
 YTQKSLSLSPG

SEQ ID NO:8 – vùng Fc của IgG

ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTVDHQLDNLNGKEYKCKVSNKGLP
 APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFLLVSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNA
 YTQKSLSLSPG

SEQ ID NO:9 – vùng Fc của IgG

ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTVDHQLDNLNGKEYKCKVSNKGLP
 APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFLLVSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNA
 YTQKSLSLSPG

SEQ ID NO:10 – hợp chất NRG4

GGGGSGGGGSGGGGS GHEEPCGPSH KSFCLNGGLC YVIPTIPSPF
 CRCVENYTGA RCEEVFL

SEQ ID NO:11 – hợp chất NRG4

GGGGSGGGGSGGGGS GHEEPCGESH KSFCLNGGLC YVIPTIPSPF
 CRCVENYTGA RCEEVFL

SEQ ID NO:12 – hợp chất NRG4

GGGGSGGGGSGGGGS GHEEPCGPSH KSFCLNGGLC YQIPTIPSPF
 CRCVENYTGA RCEEVFL

SEQ ID NO:13 – hợp chất NRG4

GGGGSGGGGSGGGGS GHEEPCGPSH KSFCLNGGLC YVIPTFPSPF
 CRCVENYTGA RCEEVFL

SEQ ID NO:14 – hợp chất NRG4

GGGGSGGGGSGGGGSGHEEPCGPSH
 KSFCLNGGLCYVIPTIPSPFCRCVANYTGA RCEEVFL

SEQ ID NO:15 – hợp chất NRG4

GGGSGGGSGGGSGHEEPCGPSHKSFCLNGGLCYVIPTFPSPFCRCVENYT
GARCEKVFL

SEQ ID NO:16 – hợp chất NRG4

GGGSGGGSGGGSGHEEPCGPSHKSFCLNGGLCYVIPTFPSPFCRCVENYT
GARCEHVFL

SEQ ID NO:17 – hợp chất NRG4

GGGSGGGSGGGSGHEEPCGESHKSFCLNGGLCYVIPTFPSPFCRCVENYT
GARCEEVFL

SEQ ID NO:18 – hợp chất NRG4

GGGSGHEEPCGPSHKSFCLNGGLCYQIPTIPSPFCRCVENYTGARCEKVFL

SEQ ID NO:19 – hợp chất NRG4

GGGSGGGSGGGSGHEEPCGPSHKSFCLNGGLCYQIPTIPSPFCRCVENYT
GARCEKVFL

SEQ ID NO:20

GGGS

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức:

GHEEPCGX₈SHKSFCLNGGLCYX₂₂IPTX₂₆PSPFCRCVX₃₅NYTGARCEX₄₄VFL

trong đó:

X₈ là P;

X₂₂ là Q;

X₂₆ là I;

X₃₅ là E; và

X₄₄ là K

(SEQ ID NO:2) và trong đó hợp chất này tùy ý bao gồm phần kéo dài đầu tận cùng N được chọn từ nhóm gồm T, PT, MPT, S, GS, GGS, GGGS (SEQ ID NO:20), và (GGGGX_n) trong đó X_n là Q, A, E hoặc S và n=1-5 (SEQ ID NO:5).

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó phần kéo dài đầu tận cùng N là SEQ ID NO:5 trong đó X_n là S và n=1.

3. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này bao gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:18.

4. Hợp chất gồm trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO:18.

5. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này có hoạt tính liên quan đến liên kết HER4 lớn hơn hoạt tính của NRG4 tự nhiên của người và ít nhất là 70% hoạt tính tối đa của NRG1 tự nhiên của người.

6. Hợp chất theo điểm 5, trong đó hợp chất này không có hoạt tính liên quan đến liên kết HER3.

7. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm 1 và chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược được dụng.

8. Dụng cụ bơm chứa hợp chất theo điểm 1.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Eli Lilly và Company

<120> Hợp chất neuregulin-4, dược phẩm và dụng cụ bơm chứa hợp chất này

<130> X22153

<150> US 62/827,386

<151> 01-04-2019

<160> 20

<170> Patent phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 47

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp	His	Glu	Glu	Pro	Cys	Gly	Pro	Ser	His	Lys	Ser	Phe	Cys	Leu	Asn
1				5					10					15	

Gly	Gly	Leu	Cys	Tyr	Val	Ile	Pro	Thr	Ile	Pro	Ser	Pro	Phe	Cys	Arg
			20					25					30		

Cys	Val	Glu	Asn	Tyr	Thr	Gly	Ala	Arg	Cys	Glu	Glu	Val	Phe	Leu
		35					40					45		

<210> 2

<211> 48

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> BIẾN THỂ

<222> (1)..(1)

<223> Xaa ở vị trí 1 được chọn từ nhóm gồm T, PT, MPT, S, GS, GGS, GGGS, và (GGGGXlambda)n trong đó Xlambda là Q,

A, E hoặc S và n=1-5 (SEQ ID NO:5), hoặc không có mặt

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa ở vị trí 9 là E hoặc P

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa ở vị trí 23 là Q hoặc V

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa ở vị trí 27 là F hoặc I

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (36)..(36)
 <223> Xaa ở vị trí 36 hoặc E hoặc A

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa ở vị trí 45 là H, K hoặc E

<400> 2

Xaa	Gly	His	Glu	Glu	Pro	Cys	Gly	Xaa	Ser	His	Lys	Ser	Phe	Cys	Leu
1				5					10					15	

Asn	Gly	Gly	Leu	Cys	Tyr	Xaa	Ile	Pro	Thr	Xaa	Pro	Ser	Pro	Phe	Cys
			20					25					30		

Arg	Cys	Val	Xaa	Asn	Tyr	Thr	Gly	Ala	Arg	Cys	Glu	Xaa	Val	Phe	Leu
		35					40					45			

<210> 3
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 3

Met	Pro	Thr	Asp	His	Glu	Glu	Pro	Cys	Gly	Pro	Ser	His	Lys	Ser	Phe
1				5					10					15	

Cys Leu Asn Gly Gly Leu Cys Tyr Val Ile Pro Thr Ile Pro Ser Pro
20 25 30

Phe Cys Arg Cys Val Glu Asn Tyr Thr Gly Ala Arg Cys Glu Glu Val
35 40 45

Phe Leu Pro Gly Ser Ser Ile Gln Thr Lys Ser Asn Leu Phe Glu Ala
50 55 60

Phe Val Ala Leu Ala Val Leu Val Thr Leu Ile Ile Gly Ala Phe Tyr
65 70 75 80

Phe Leu Cys Arg Lys Gly His Phe Gln Arg Ala Ser Ser Val Gln Tyr
85 90 95

Asp Ile Asn Leu Val Glu Thr Ser Ser Thr Ser Ala His His Ser His
100 105 110

Glu Gln His
115

<210> 4
<211> 47
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 4

Gly His Glu Glu Pro Cys Gly Pro Ser His Lys Ser Phe Cys Leu Asn
1 5 10 15

Gly Gly Leu Cys Tyr Gln Ile Pro Thr Ile Pro Ser Pro Phe Cys Arg
20 25 30

Cys Val Glu Asn Tyr Thr Gly Ala Arg Cys Glu Lys Val Phe Leu
35 40 45

<210> 5

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (1)..(5)
 <223> SEQ ID NO:5 được đại diện thêm ở dạng (GGGGX λ) n , trong đó:
 λ là Q, A, E hoặc S; và n là 1-5.

<220>
 <221> BIẾN THỂ
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa ở vị trí 5 là λ trong đó λ là Q, A, E hoặc S

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Xaa
 1 5

<210> 6
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 6

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
 1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 35 40 45

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
65 70 75 80

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
100 105 110

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
115 120 125

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
130 135 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
165 170 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
180 185 190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
195 200 205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215 220

<210> 7

<211> 221

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 7

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
35 40 45

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
65 70 75 80

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
100 105 110

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
115 120 125

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
130 135 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
165 170 175

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
180 185 190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
195 200 205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215 220

<210> 8
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 8

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
 1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro
 20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 35 40 45

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
 65 70 75 80

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 100 105 110

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 115 120 125

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 165 170 175

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 180 185 190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 195 200 205

Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 210 215 220

<210> 9
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 9

Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
 1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ala Ser Arg Thr Pro
 20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 35 40 45

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
 65 70 75 80

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 100 105 110

Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 115 120 125

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
 130 135 140

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 145 150 155 160

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 165 170 175

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 180 185 190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 195 200 205

Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 210 215 220

<210> 10

<211> 62

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 10

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

His Glu Glu Pro Cys Gly Pro Ser His Lys Ser Phe Cys Leu Asn Gly
 20 25 30

Gly Leu Cys Tyr Val Ile Pro Thr Ile Pro Ser Pro Phe Cys Arg Cys
 35 40 45

Val Glu Asn Tyr Thr Gly Ala Arg Cys Glu Glu Val Phe Leu
 50 55 60

<210> 11
 <211> 62
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 11

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

His Glu Glu Pro Cys Gly Glu Ser His Lys Ser Phe Cys Leu Asn Gly
 20 25 30

Gly Leu Cys Tyr Val Ile Pro Thr Ile Pro Ser Pro Phe Cys Arg Cys
 35 40 45

Val Glu Asn Tyr Thr Gly Ala Arg Cys Glu Glu Val Phe Leu
 50 55 60

<210> 12
 <211> 62
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 12

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

His Glu Glu Pro Cys Gly Pro Ser His Lys Ser Phe Cys Leu Asn Gly
 20 25 30

Gly Leu Cys Tyr Gln Ile Pro Thr Ile Pro Ser Pro Phe Cys Arg Cys
 35 40 45

Val Glu Asn Tyr Thr Gly Ala Arg Cys Glu Glu Val Phe Leu
 50 55 60

<210> 13
 <211> 62
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 13

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

His Glu Glu Pro Cys Gly Pro Ser His Lys Ser Phe Cys Leu Asn Gly
 20 25 30

Gly Leu Cys Tyr Val Ile Pro Thr Phe Pro Ser Pro Phe Cys Arg Cys
 35 40 45

Val Glu Asn Tyr Thr Gly Ala Arg Cys Glu Glu Val Phe Leu
 50 55 60

<210> 14
 <211> 62
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 14

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

His Glu Glu Pro Cys Gly Pro Ser His Lys Ser Phe Cys Leu Asn Gly
 20 25 30

Gly Leu Cys Tyr Val Ile Pro Thr Ile Pro Ser Pro Phe Cys Arg Cys
 35 40 45

Val Ala Asn Tyr Thr Gly Ala Arg Cys Glu Glu Val Phe Leu
 50 55 60

<210> 15
 <211> 62
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

His Glu Glu Pro Cys Gly Pro Ser His Lys Ser Phe Cys Leu Asn Gly
 20 25 30

Gly Leu Cys Tyr Val Ile Pro Thr Phe Pro Ser Pro Phe Cys Arg Cys
 35 40 45

Val Glu Asn Tyr Thr Gly Ala Arg Cys Glu Lys Val Phe Leu
 50 55 60

<210> 16
 <211> 62
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 16

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

His Glu Glu Pro Cys Gly Pro Ser His Lys Ser Phe Cys Leu Asn Gly
 20 25 30

Gly Leu Cys Tyr Val Ile Pro Thr Phe Pro Ser Pro Phe Cys Arg Cys
 35 40 45

Val Glu Asn Tyr Thr Gly Ala Arg Cys Glu His Val Phe Leu
 50 55 60

<210> 17
 <211> 62
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 17

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

His Glu Glu Pro Cys Gly Glu Ser His Lys Ser Phe Cys Leu Asn Gly
 20 25 30

Gly Leu Cys Tyr Val Ile Pro Thr Phe Pro Ser Pro Phe Cys Arg Cys
 35 40 45

Val Glu Asn Tyr Thr Gly Ala Arg Cys Glu Glu Val Phe Leu
 50 55 60

<210> 18
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 18

Gly Gly Gly Gly Ser Gly His Glu Glu Pro Cys Gly Pro Ser His Lys
 1 5 10 15

Ser Phe Cys Leu Asn Gly Gly Leu Cys Tyr Gln Ile Pro Thr Ile Pro
 20 25 30

Ser Pro Phe Cys Arg Cys Val Glu Asn Tyr Thr Gly Ala Arg Cys Glu
 35 40 45

Lys Val Phe Leu
50

<210> 19
<211> 62
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 19

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

His Glu Glu Pro Cys Gly Pro Ser His Lys Ser Phe Cys Leu Asn Gly
20 25 30

Gly Leu Cys Tyr Gln Ile Pro Thr Ile Pro Ser Pro Phe Cys Arg Cys
35 40 45

Val Glu Asn Tyr Thr Gly Ala Arg Cys Glu Lys Val Phe Leu
50 55 60

<210> 20
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 20

Gly Gly Gly Ser
1