I787596

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本　**(11)證書號數：TW I787596 B**

(45)公告日： 中華民國 111 (2022) 年 12 月 21 日

(21)申請案號：109110143　(22)申請日： 中華民國 109 (2020) 年 03 月 26 日

(51)Int. Cl.：　*C07K14/475 (2006.01)*　*A61K38/18 (2006.01)*

A61P9/04 (2006.01)

(30)優先權：2019/04/01　美國　62/827,386

(71)申請人：美商美國禮來大藥廠 (美國) ELI LILLY AND COMPANY (US)

美國

(72)發明人：戴　強納森　魏斯雷 DAY, JONATHAN WESLEY (US)；休爾　約瑟夫　喬治 HEUER, JOSEF GEORGE (US)；慕皮迪　阿維納什 MUPPIDI, AVINASH (IN)；倪微 NI, WEI (CN)；潘蔻克　詹姆士　大衛 PANCOOK, JAMES DAVID (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

CN　101007027A

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：32 項　圖式數：0　共 64 頁

(54)名稱

神經調節蛋白-4(NEUREGULIN-4)化合物及使用方法

(57)摘要

本發明係關於神經調節蛋白(NRG)4 化合物及用 NRG4 化合物之治療方法。

The present invention relates to neuregulin (NRG) 4 compounds and methods of treatment with NRG4 compounds.

公告本

I787596

【發明摘要】

【中文發明名稱】

神經調節蛋白-4(NEUREGULIN-4)化合物及使用方法

【英文發明名稱】

NEUREGULIN-4 COMPOUNDS AND METHODS OF USE

【中文】

本發明係關於神經調節蛋白(NRG)4化合物及用NRG4化合物之治療方法。

【英文】

The present invention relates to neuregulin (NRG) 4 compounds and methods of treatment with NRG4 compounds.

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

神經調節蛋白-4(NEUREGULIN-4)化合物及使用方法

【英文發明名稱】

NEUREGULIN-4 COMPOUNDS AND METHODS OF USE

【技術領域】

【0001】 本發明係關於神經調節蛋白(NRG)4化合物及用NRG4化合物之治療方法。本發明之NRG4化合物較佳具有與人類表皮生長因子受體(HER)4之有效結合及與該結合相關之有效活性。較佳的NRG4化合物可適用於改善心臟功能及/或治療其中HER4結合及所得活性起顯著作用之疾病，諸如心臟衰竭(HF)(包括射出分率下降之HF(HFrEF))。

【先前技術】

【0002】 存在對HF之新的經改良之治療的未滿足之醫學需求。當前可用療法意欲減緩疾病進展且改善症狀，且依賴於血液動力學變化來降低衰竭心臟之工作負荷。此等療法包括之藥劑意欲：(a)降低心率，諸如β阻斷劑及伊伐布雷定(ivabradine)；(b)降低血壓，諸如血管收縮素轉化酶(ACE)抑制劑、血管收縮素II受體阻斷劑(ARB)、鹽皮質激素受體拮抗劑(MRA)及沙庫必曲(sacubitril)/纈沙坦(valsartan)(ENTRESTO®)；及/或(c)治療或預防容量負荷過重，諸如利尿劑及MRA。然而，此等治療並不直接治療心臟，且具有諸如需要劑量滴定及監測低血壓之實踐限制。此外，即使在此等現有可用治療選擇方案之情況下，所有HF患者(甚至輕度症狀之彼等患者)處於死亡之高風險下。參見例如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。因此，需要新的及改良之HF治療。

【0003】 已進行用以鑑別新的治療選擇方案之研究及開發工作。舉例而言，WO2014/187342旨在描述通過NRG之延長釋放來預防、治療或延緩HF，該NRG經陳述包括NRG1、NRG2、NRG3及NRG4。該公開案亦描述一種臨床研究，其據稱對患有慢性心臟衰竭之患者長期投與NRG-1。

【0004】 然而，與現有療法相比，仍需要具有改良之功效及降低之毒性風險的治療選擇方案。需要改良長期結果(包括提高之存活率及降低之住院率)的療法。亦需要經由除改變血液動力學外之機制改善心臟功能之療法，其可能修改或逆轉疾病。亦需要更好耐受性的療法，尤其包括對於患有諸如低血壓、低鉀血症及腎功能異常之合併症之患者的治療。亦需要改善患有晚期疾病之患者之生活品質(QOL)的療法。本發明力圖滿足此等重要未滿足需求中之一或多者。

【發明內容】

【0005】 因此，本發明提供具有與選擇性結合至HER4相關之活性的NRG4化合物。本發明之NRG4化合物幾乎不結合至HER3，使得與HER3相關之毒性及/或耐受性問題之風險降低。

【0006】 本發明亦提供使用NRG4化合物治療或預防CVD及相關病況(包括(特定言之)HF)之方法。本發明之較佳NRG4化合物及方法降低CV相關死亡或HF相關住院之風險、降低心肌梗塞(MI)或中風之風險、降低需要左心室輔助裝置(LVAD)或心臟移植之概率、改善心臟功能及結構、及/或改善與HF相關之症狀及身體限制，使得QoL改善。較佳NRG4化合

物及方法可在不需要滴定或監測之情況下與標準護理(SoC)組合使用，且不會增加低血壓、惡化腎功能、導致電解質不平衡、造成肝功能障礙、增加腫瘤發病率及/或導致持續性精液過少。

【0007】 本發明亦提供NRG4化合物，其相較於人類NRG4之胺基酸序列(SEQ ID NO:1)包含位置1之D殘基修飾成為G殘基及多至五個另外修飾。

【0008】 本發明亦提供包含下式之NRG4化合物：

X_0GHEEPCGX_8SHKSFCLNGGLCYX_{22}IPTX_{26}PSPFCRCVX_{35}NYT GARCEX_{44}VFL；其中：X_0選自由以下組成之群：T、PT、MPT、S、GS、GGS、GGGS及$(GGGGX_\lambda)_n$，其中X_λ為Q、A、E或S且n=1-5(SEQ ID NO:5)，或不存在；X_8為E或P；X_{22}為Q 或V；X_{26}為F或I；X_{35}為E或A；且X_{44}為H、K或E (SEQ ID NO:2)。

【0009】 在另一態樣中，本發明提供一種治療或預防有需要之患者的HFrEF之方法，其包含向該患者投與治療有效量之NRG4化合物持續24-96小時。

【0010】 本發明之另一實施例提供用於療法中之本發明之NRG4化合物。

【0011】 本發明之另一實施例提供用於治療或預防HFrEF之NRG4化合物，其中投與該NRG4化合物24-96小時。

【0012】 本發明之另一實施例提供用於製造用於治療或預防HFrEF之藥物的NRG4化合物，其中投與NRG4化合物24-96小時。

【0013】 本發明之另一實施例提供一種醫藥組合物，其包含本發明之NRG4化合物及醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑。

【0014】 本發明之另一實施例提供一種泵裝置，其包含本發明之NRG4化合物。在某些實施例中，該泵為貼片泵。

【實施方式】

【0015】 本申請案根據35 U.S.C. §119(e)主張於2019年4月1日申請之美國臨時申請案第62/827,386號之權利；其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【0016】 NRG4為NRG蛋白質家族之四個成員中之一者，其本身為稱為表皮生長因子(EGF)蛋白之更大蛋白質家族之一部分。EGF之蛋白質家族包括EGF本身以及其他蛋白質(稱為類EGF蛋白)，其共享類似於EGF之某些結構特徵。類EGF蛋白包括NRG1、NRG2、NRG3及NRG4，以及此等蛋白質之結合肝素之類EGF生長因子(HB-EGF)、轉型生長因子-α、雙調蛋白(AR)、表皮調節素(EPR)、上皮有絲分裂原(epigen)、β細胞調節素(BTC)及各種異構體。儘管此等配位體為細胞膜外蛋白，但各種細胞刺激引起細胞金屬蛋白酶活化，從而引起蛋白質之EGF結構域的蛋白分解釋放，該蛋白質接著自由結合於受體且啟動信號傳導。EGF蛋白質家族之各種成員具有多種多樣的發育相關作用，包括與許多疾病(包括癌症)之正常發展以及病理學相關之作用。該等作用係經由與被稱為ErbB受體家族的四種受體酪胺酸激酶亞家族(EGFR(ErbB-1)、HER2(ErbB-2)、HER3(ErbB-3)、HER4(ErbB-4))及此等受體之異構體的相互作用來介導。NRG家族之成員本身具有經由其與EGFR、HER3及HER4之特定相互作用介導之不同作用。雖然HER2不結合NRG家族之成員，但HER2藉由在EGFR、HER3及HER4被配位體化後立即與其形成異二聚體而促進下游信號傳導。因此，本文中對HER3(或HER3/2或HER2/3)或HER4(或

HER4/2或HER2/4)活性之提及應理解為由以下產生之活性：在配位體(諸如NRG家族之成員)結合HER3或HER4之後的下游信號傳導、及該受體與HER2結合之後續異二聚化。

【0017】 如上文所提及，NRG家族之不同成員具有由不同受體親和力及活性特徵介導之不同作用。舉例而言，NRG1化合物與HER3及HER4之胞外結構域相互作用，且在多個器官正常育及癌症之發病機制中起作用。HER4結合及由其產生之活性已與心臟功能及結構改善相關，而HER3結合及由其產生之活性已與癌症、噁心、腹瀉及肝毒性相關。參見例如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。另一方面，NRG4結合且活化HER4，但幾乎不結合HER3或在HER3下幾乎不具有活性。

【0018】 NRG4表現為具有SEQ ID NO:3中所闡述之序列之115個胺基酸前驅蛋白：

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

(SEQ ID NO:3)。所表現之蛋白為跨膜蛋白，其具有跨膜部分、細胞質部分及細胞外部分，該跨膜蛋白包括在細胞刺激後以蛋白分解方式釋放之EGF部分。本發明之NRG4化合物包含來自胺基酸編號4-50之上文所描述之所表現蛋白(SEQ ID NO:3)之部分，其在所表現蛋白之細胞外部分

中，如下文在SEQ ID NO:1中所闡述：

DHEEPCGPSH KSFCLNGGLC YVIPTIPSPF CRCVENYTGA RCEEVFL

(SEQ ID NO:1)。為避免疑問，在本發明之NRG4化合物之情形下，任何胺基酸修飾在本文中之編號係基於上文在SEQ ID NO:1中所闡述之序列。

【0019】 當在本文中使用時，術語「NRG4化合物」意謂包含胺基酸序列SEQ ID NO:1之全部或一部分或其變異體或結合物之蛋白質或肽。當在本文中使用時，術語「變異體」係指具有一或多個對於人類蛋白之胺基酸序列之修飾之胺基酸序列。此類修飾包括原生人類序列中之一或多個胺基酸經另一天然或非天然胺基酸取代及/或缺失或添加原生人類序列中之一或多個胺基酸。當在本文中使用時，術語「結合物」係指包含SEQ ID NO:1之全部或一部分或其變異體，且藉由共價鍵附接至蛋白質、肽或另一化學部分的蛋白質或肽。此類附接包括例如IgG Fc區、人類白蛋白、富甘胺酸肽或脂肪酸部分。此外，除非另外明確說明，否則當NRG4化合物描述於實施例或敍述於本文申請專利範圍中時，應理解該化合物可呈游離或鹽形式。

【0020】 本發明提供NRG4化合物，其包含式SEQ ID NO:1，具有一或多種對其之修飾，且具有比原生人類NRG4更強之HER4親和力及HER4結合相關活性，且其至少與原生人類NRG4一樣，具有相對於HER3受體結合至HER4受體之選擇性。可藉由此項技術中已知之技術(包括以下實例中所述之彼等技術)測定對HER4及HER3受體之親和力及HER4及HER3受體處之效能。在某些實施例中，本發明之NRG4化合物具有由HER4結合產生之效能，該效能至少為原生人類NRG1 EGF結構域之最大

效能之50%。在某些實施例中，本發明之NRG4化合物具有由HER4結合產生之效能，該效能至多為原生人類NRG1 EGF結構域之最大效能之90%。

【0021】 當在本文中在描述某些NRG4化合物時使用時，術語「無HER3結合相關活性」意謂當使用活體外分析(諸如以下實例中描述之彼等分析)測試時，與原生NRG4之活性相比，彼等化合物不具有更大之與HER3結合相關之活性。

【0022】 本發明之NRG4化合物包含一或多個對於以上在SEQ ID NO:1中闡述之胺基酸序列之修飾，包括至少在位置1處之D經G取代(亦即D1G)。發現D1G取代顯著改良與HER4之結合而不會負面影響相對於HER3之選擇性，包括在含有對於野生型NRG4胺基酸序列之另外修飾之NRG4化合物之情形下。在本發明之某些較佳實施例中與D1G組合的發現-例如，就HER4結合及/或相對於HER3之選擇性而言-具有有益作用之其他胺基酸修飾包括位置8、22、26、35及44中之一或多者處之修飾，尤其包括以下中之一或多者：P8E、V22Q、I26F、E35A、E44H及E44K。本發明之NRG4化合物之尤其較佳實施例為具有選自以下清單之三個胺基酸取代之組合的三重變異體：D1G/I26F/E44K；D1G/I26F/P8E；D1G/I26F/E44H；及D1G/V22Q/E44K。本發明之NRG4化合物之最佳實施例包含以下三個胺基酸取代：D1G/V22Q/E44K，如SEQ ID NO:4中所闡述：

GHEEPCGPSHKSFCLNGGLCYQIPTIPSPFCRCVENYTGARCEKVFL
(SEQ ID NO:4)

【0023】 在某些實施例中，本發明之NRG4化合物亦可在上文SEQ ID NO:1中所闡述之序列之C端或N端處包括將在SEQ ID NO:3中所闡述

之全長表現蛋白中發現之胺基酸中之一或多者，其限制條件為包括此類胺基酸不消除其與HER4之比原生更強勁之結合及在HER4處之活性或相對於HER3之選擇性。

【0024】 在某些實施例中，本發明之NRG4化合物亦可包含在SEQ ID NO:3中所闡述之全長蛋白中未發現之一或多個另外胺基酸或其他化學部分。舉例而言，本發明之某些NRG4化合物藉由共價鍵結合至蛋白質、富甘胺酸肽及/或其他化學部分。在某些實施例中，本發明之NRG4化合物包含富甘胺酸肽，其包含序列$(GGGGX_\lambda)_n$，其中X_λ為Q、A、E或S且其中n=1-5(SEQ ID NO:5)。在某些實施例中，本發明之NRG4化合物包含SEQ ID NO:5中所闡述之序列，其中在N端，X_λ為S且n=1。

【0025】 在某些實施例中，本發明之NRG4化合物包含下式：

X_0GHEEPCGX_8SHKSFCLNGGLCYX_{22}IPTX_{26}PSPFCRCVX_{35}NYT GARCE X_{44}VFL；其中：X_0選自由以下組成之群：T、PT、MPT、S、GS、GGS、GGGS及$(GGGGX_\lambda)_n$，其中X_λ為Q、A、E或S且n=1-5(SEQ ID NO:5)，或不存在；X_8為E或P；X_{22}為Q或V；X_{26}為F或I；X_{35}為E或A；且X_{44}為H、K或E (SEQ ID NO:2)。

【0026】 在某些實施例中，X_8為P；X_{22}為V；X_{26}為I；X_{35}為E；且X_{44}為E。在其他實施例中，X_8為E；X_{22}為V；X_{26}為I；X_{35}為E；且X_{44}為E。在其他實施例中，X_8為P；X_{22}為Q；X_{26}為I；X_{35}為E；且X_{44}為E。在其他實施例中，X_8為P；X_{22}為V；X_{26}為F；X_{35}為E；且X_{44}為E。在其他實施例中，X_8為P；X_{22}為V；X_{26}為I；X_{35}為A；且X_{44}為H或E。在其他實施例中，X_8為P；X_{22}為V；X_{26}為F；X_{35}為E；且X_{44}為K。在其他實施例中，X_8為P；X_{22}為V；X_{26}為F；X_{35}為E；且X_{44}為H。在其他實施例中，

X_8為E；X_{22}為V；X_{26}為F；X_{35}為E；且X_{44}為E。在較佳實施例中，X_8為P；X_{22}為Q；X_{26}為I；X_{35}為E；且X_{44}為K。

【0027】 在某些實施例中，本發明之NRG4化合物包含IgG Fc區。如本文所用，術語「IgG Fc區」係指人類IgG抗體片段之恆定區。特定言之，Fc區包括抗體之CH2及CH3恆定區結構域，且亦可包括一些或所有鉸鏈區。包含於本發明之某些NRG4化合物中之IgG Fc區可包含來自IgG抗體之一個重鏈或兩個重鏈的恆定區之片段，其經由非共價相互作用及二硫鍵彼此關聯。當在本文中使用時，術語IgG Fc區亦包括已修飾、延長及/或截短(例如)以改變NRG4化合物之特性或特徵(諸如其效能及/或藥物動力學)的此類抗體片段之型式。在本發明之某些實施例中，人類IgG Fc區亦可移除鉸鏈區中之一些或全部以便簡化二硫介導之Fc二聚化。在本發明之某些實施例中，IgG Fc區包含具有不同胺基酸序列之兩個重鏈之二聚體，其可藉由此項技術中已知之技術製備。參見例如Lewis SM等人NAT. BIOTECHNOL. 32(2):191-8 (2014); Carter, J. IMMUNOL. METHODS, 248(1-2):7-15 (2001)；Ridgway, J. B.等人PROTEIN ENG. 9(7):617-2 (1996)。

【0028】 一個較佳IgG Fc區為以下兩個胺基酸鏈之二聚體：

ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK
TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL

SPG (SEQ ID NO:6)；及

ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK
TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL

SPG (SEQ ID NO:7)。

【0029】 另一較佳IgG Fc區為以下兩個胺基酸鏈之二聚體：

ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK
TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNAYTQKSLSL

SPG (SEQ ID NO:8)；及

ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK
TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNAYTQKSLSL

SPG (SEQ ID NO:9)。

【0030】在本發明之NRG4化合物包含IgG Fc區之某些實施例中，IgG Fc區借助於連接子附接。在某些實施例中，連接子為包含以上在SEQ ID NO:5中闡述之序列之肽連接子，其中X_λ為Q、A、E或S且n=1-5。在某些實施例中，連接子包含SEQ ID NO:5之序列，其中X_λ為S且n為3。在本發明之NRG4化合物包含藉助於肽連接子附接之IgG Fc區的某些實施例中，肽連接子之N端殘基直接融合至IgG Fc區之一個鏈之C端殘基且NRG4促效劑之N端殘基直接融合至肽連接子之C端殘基。

【0031】在本發明之某些NRG4化合物中包括IgG Fc區可在生產及/或投與方面具有優勢。關於生產，可使用此項技術中已知之生物表現技術(諸如以下實例中所描述之彼等技術)快速產生此類化合物。使用此類技術之快速產生在所有研究及開發階段中提供效率，尤其包括產生用於篩選結合及/或活性之NRG4變異體。關於投與，包含IgG Fc區之NRG4化合物可具有延長之藥物動力學概況，包括長達約14天之血清暴露。

【0032】然而，儘管有彼等優勢，但亦已發現，如以下實例中所指出長期暴露於NRG4(包括大於約8天之血清暴露)可產生心臟毒性風險。亦已發現可藉由製備具有略微更短藥物動力學半衰期(包括約8天之血清暴露)之化合物(例如經由使用經修飾之Fc區)而減弱毒性風險，儘管並非在所有物種中消除。

【0033】 亦已發現，相比於上述8-14天暴露持續時間，更短時期暴露於NRG4化合物能夠提供足夠且持續的功效，而無以上段落中所述之NRG4化合物之心臟毒性風險。此類暴露持續時間之實例為約1天至約7天，較佳2、3或4天。因此，在某些實施例中，本發明提供一種治療或預防HFrEF之方法，其中以足以提供約24至約168小時之治療有效血清濃度之量投與NRG4化合物。在某些實施例中，以足以提供約24至約96小時之治療有效血清濃度之量投與NRG4化合物。在某些實施例中，以足以提供約24小時之治療有效血清濃度之量投與NRG4化合物。在某些實施例中，以足以提供約48小時之治療有效血清濃度之量投與NRG4化合物。在某些實施例中，以足以提供約72小時之治療有效血清濃度之量投與NRG4化合物。在某些實施例中，以足以提供約96小時之治療有效血清濃度之量投與NRG4化合物。

【0034】 可經由提供具有允許血清暴露上文段落中描述之時段的藥物動力學概況之NRG4化合物之單次快速注射、或經由連續投與(例如經由使用泵)快速清除NRG4化合物歷時以上段落中描述之時段來達成以上段落中描述之暴露持續時間。

【0035】 當在本文中使用時，術語「持續功效」係指超出投與NRG4化合物之時間段的心臟衰竭相關之改善。舉例而言，在以足以提供72小時治療有效血清濃度之量投與NRG4化合物之某些實施例中，在某些實施例中此類治療方案之功效可持續介於約6天(投與之持續時間的約2倍)至約4個月(投與之持續時間的約30倍)範圍內的時間段。相對於投與之持續時間(亦即提供治療有效血清濃度之時間量)的功效之持續時間(亦即可見臨床益處之時間量)在本文之某些實施例中被鑑別為「功效:投與比

率」。在某些實施例中，功效:投與比率在約2至約50範圍內。在某些實施例中，功效:投與比率在約20至約45範圍內。在某些實施例中，功效:投與比率為約22、約30或約45。

【0036】 此類持續功效允許以足以在所需時間段內提供治療有效血清濃度之量相對不頻繁地投與NRG4化合物。在某些實施例中，每六個月投與一次NRG4化合物。在某些實施例中，僅僅每週一次頻繁地投與NRG4化合物。在其他實施例中，每月投與兩次NRG4化合物。在其他實施例中，每月投與一次NRG4化合物。在某些實施例中，每季投與一次NRG4化合物。在其他較佳實施例中，每六個月投與一次NRG4化合物。

【0037】 如本文所使用，術語「治療」或「以治療」包括抑制、減緩、停止或逆轉現存症狀或病症之進程或嚴重程度。根據本發明之心臟衰竭或HFrEF之治療可反映在與心臟衰竭相關之各種量度中之一或多者中，包括例如：左心室射出分率(LVEF)增加、左心室收縮末期容積(left ventricular cavity volume at end-systole，LVESV)增加、左心室舒張末期壓(left ventricular end-diastolic pressure，LVEDP)降低、CV死亡及/或心臟衰竭住院之風險降低、總死亡率之風險降低、心肌梗塞(MI)之風險降低、中風風險降低、需要左心室輔助裝置(LVAD)植入及或心臟移植之風險降低、心臟衰竭之症狀及身體限制改善及/或生存品質(QoL)改善。可在治療至少1個月之後達成根據本發明之實施例之某些治療益處。可在治療至少6個月之後達成根據本發明之實施例之某些治療益處。可在治療至少1年之後達成根據本發明之實施例之某些治療益處。

【0038】 在某些實施例中，投與根據本發明之NRG4化合物使得LVEF顯著改善。在某些實施例中，投與根據本發明之NRG4化合物使得

LVEF改善至少5%。在某些實施例中，在6個月治療之後，投與根據本發明之NRG4化合物使得LVEF改善至少5%。在某些實施例中，在1年治療之後，投與根據本發明之NRG4化合物使得LVEF改善至少5%。在某些實施例中，在1年治療之後，投與根據本發明之NRG4化合物使得LVESV改善至少5%。在某些實施例中，在1年治療之後，投與根據本發明之NRG4化合物使得LVEDP顯著降低。在某些實施例中，投與根據本發明之NRG4化合物使得整體縱向應變(GLS)顯著降低。在某些實施例中，投與根據本發明之NRG4化合物使得GLS降低至少3.5%。在某些實施例中，投與本發明之NRG4化合物使得CV死亡及/或HF住院之風險降低至少15%。在某些實施例中，投與本發明之NRG4化合物使得總死亡、MI、中風、LVAD植入或心臟移植中之一或多者風險顯著降低。在某些實施例中，投與本發明之NRG4化合物使得心臟衰竭之症狀及身體限制及/或QoL顯著改善。

【0039】另外，如上文所指出，投與根據呈現之某些實施例之NRG4化合物能夠提供心臟衰竭相關量度(諸如上文所述之量度)之改善而不增加安全風險。因此，在較佳實施例中，投與根據本發明之NRG4化合物不會增加安全風險，諸如低血壓增加；腎功能惡化；電解質不平衡；肝功能障礙；腫瘤發生或持續性精液過少。

【0040】當在本文中使用時，術語「治療有效量」係指對患者提供所需效果之NRG4化合物之量或劑量。在NRG4化合物具有延長之藥物動力概況之情況下，此劑量可為單次或多次劑量投與時給予之量。在更快作用化合物投與一段時間(諸如上述24至96小時輸注)之情況下，劑量或量可表示為在該時間段期間投與NRG4化合物之總質量(例如總mg)，或在該時間期間投與NRG4化合物之速率(例如mg/min)，或在投與時段期間NRG4

化合物之血漿濃度。可輕易由熟習此項技術者經由使用已知技術及藉由觀測在類似情形下獲得之結果來測定有效量。在某些實施例中，每季投與一次之劑量可落在足以在投與期間內提供約3至約100 nM之血漿濃度之劑量範圍內。

【0041】 投與根據本發明之NRG4化合物通常為非經腸，例如靜脈內(IV)、皮下(SC)或腹膜內(IP)。因此，在本發明之某些實施例中，經靜脈內投與NRG4化合物。在本發明之其他實施例中，經腹膜內投與NRG4化合物。在其他實施例中，皮下投與NRG4化合物。

【0042】 為了控制最佳化及持續功效之暴露期間具有足夠心臟毒性界限，NRG4化合物之非經腸投與較佳為連續或間歇輸注。舉例而言，許多類型之輸注泵用於輸射大範圍之藥物且此類泵可用於投與根據本發明之NRG4化合物。近年來，已開發貼片泵，其小於傳統裝置且直接貼附至患者之皮膚，使得對患者之日常活動的干擾最小。因此，在某些實施例中，藉由輸注泵或貼片泵投與NRG4化合物。較佳地，藉由貼片泵投與NRG4化合物。

【0043】 本發明亦涵蓋適用於產生本發明之NRG4化合物之新穎中間物及製程。可藉由此項技術中已知之多種程序(包括使用化學合成或生物表現之製程，諸如以下實例中所述之彼等製程)來製備本發明之中間物及NRG4化合物。

【0044】 關於化學合成，所描述之途徑中之每一者之特定合成步驟可以不同方式組合以製備本發明之NRG4化合物。試劑及起始物質係一般技術者容易獲得的。

【0045】 關於生物表現，化合物將在序列已可操作地連接至表現控

制序列之後表現於宿主細胞中。化合物可容易地產生於哺乳動物細胞(諸如CHO、NSO、HEK293、BHK或COS細胞)中；細菌細胞(諸如大腸桿菌、枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)或螢光假單胞菌(*Pseudomonas fluorescens*))中；昆蟲細胞中或真菌或酵母細胞中，該等細胞係使用此項技術中已知之技術培養。可藉由熟知方法將含有所關注聚核苷酸序列之載體轉移至宿主細胞中，該等方法視細胞宿主之類型而變化。可採用各種蛋白純化方法且此類方法為此項技術中已知。

【0046】 如上文所指出，所有HF患者，甚至輕度症狀之彼等患者處於高死亡風險下。因此，當在本文中使用時，提及治療心臟衰竭(HF)之「有需要之患者」可指具有HF之廣泛範圍之個體，包括具有如下所述之廣泛範圍疾病嚴重程度之彼等個體。紐約心臟協會(NYHA)已提供HF程度或嚴重程度之分類方案，如下表1中所概述：

NYHA級別	**症狀**
I	不限制身體活動。日常身體活動不會造成過度疲勞、心悸、呼吸困難(呼吸短促)。
II	身體活動略微受限。休息時舒適。日常身體活動會造成疲勞、心悸、呼吸困難(呼吸短促)。
III	身體活動顯著受限。休息時舒適。低於日常的活動會導致疲勞、心悸或呼吸困難。
IV	不能在無不適之情況下進行任何身體活動。在靜止時有心臟衰竭之症狀。若進行任何身體活動，不適增加。

表1.

【0047】 在某些實施例中，有需要之患者為心臟衰竭NYHA級別II-IV。在某些實施例中，有需要之患者為心臟衰竭NYHA級別II。在某些實施例中，有需要之患者為心臟衰竭NYHA級別III。在某些實施例中，有需要之患者為心臟衰竭NYHA級別IV。在某些實施例中，有需要之患者為心臟衰竭NYHA級別II-III。

【0048】 如上所述，心臟衰竭之現有治療性治療選項(包括當前護理標準)經由血液動力學機制改善症狀且減緩疾病進展-例如降低血壓、心率及/或血容量-以減小衰竭心臟之工作負荷。相比之下，本發明之NRG4化合物經由不同作用機制(亦即選擇性HER4結合及由其產生之活性)實現其作用，此直接改善心肌細胞存活及細胞代謝且促進心肌再生。由於此等不同作用機制，除了現有SoC亦可投與本發明之NRG4化合物而無需滴定或監測。因此，在某些實施例中，本發明之NRG4化合物可與一或多種用於心臟衰竭之另外治療組合投與。在某些實施例中，心臟衰竭之一或多種另外治療選自由以下組成之群：β阻斷劑、ACE抑制劑、ARB、MRA、利尿劑、伊伐布雷定及沙庫必曲/纈沙坦(ENTRESTO®)。在某些實施例中，本發明之NRG4化合物可與SGLT2抑制劑或sGC活化劑組合投與。

【0049】 本發明之NRG4化合物亦可在治療其他疾病或病況中具有效用，該等疾病或病況包括(但不限於)射出分率保留型心臟衰竭(HFpEF)、其他心臟相關病症或病況、帕金森氏病(Parkinson's disease)、阿耳滋海默症(Alzheimer's disease)、大腸急躁症、骨骼病症、腎病、糖尿病、代謝疾病、非酒精性脂肪肝病(NAFLD)及非酒精性脂肪變性肝炎(NASH)。

【0050】 其他實施例如下描述：

一種NRG4化合物，其相較於人類NRG4之胺基酸序列(SEQ ID NO:1)包含位置1之D殘基修飾為G殘基及多至五個另外修飾。

【0051】 前述實施例之NRG4化合物具有不超過4種另外修飾。在一個實施例中，NRG4化合物具有不超過3種另外修飾。在一個實施例中，NRG4化合物具有不超過2種另外修飾。

【0052】 上述實施例中任一者之NRG4化合物，其中該化合物包括至少一個在選自由以下組成之群的位置處之修飾：8、22、26、35及44。

【0053】 一種化合物，其包含下式：

X_0GHEEPCGX_8SHKSFCLNGGLCYX_{22}IPTX_{26}PSPFCRCVX_{35}NYT GARCE X_{44}VFL；

其中：X_0選自由以下組成之群：T、PT、MPT、S、GS、GGS、GGGS及$(GGGGX_\lambda)_n$，其中X_λ為Q、A、E或S且n=1-5(SEQ ID NO:5)，或不存在；X_8為E或P；X_{22}為Q或V；X_{26}為F或I；X_{35}為E或A；且X_{44}為H、K或E (SEQ ID NO:2)。

【0054】 如以上實施例之化合物，其中X_8為P；X_{22} 為V；X_{26}為I；X_{35}為E；且X_{44}為E。

【0055】 如以上描述之實施例中任一者之化合物，其中X_8為E；X_{22}為V；X_{26}為I；X_{35}為E；且X_{44}為E。

【0056】 如以上描述之實施例中任一者之化合物，其中X_8為P；X_{22}為Q；X_{26}為I；X_{35}為E；且X_{44}為E。

【0057】 如以上描述之實施例中任一者之化合物，其中X_8為P；X_{22}為V；X_{26}為F；X_{35}為E；且X_{44}為E。

【0058】 如以上描述之實施例中任一者之化合物，其中X_8為P；X_{22}為V；X_{26}為I；X_{35}為A；且X_{44}為H或E。

【0059】 如以上描述之實施例中任一者之化合物，其中X_8為P；X_{22}為V；X_{26}為F；X_{35}為E；且X_{44}為K。

【0060】 如以上描述之實施例中任一者之化合物，其中X_8為P；X_{22}為V；X_{26}為F；X_{35}為E；且X_{44}為H。

【0061】 如以上描述之實施例中任一者之化合物，其中X_8為E；X_{22}為V；X_{26}為F；X_{35}為E；且X_{44}為E。

【0062】 如以上描述之實施例中任一者之化合物，其中X_8為P；X_{22}為Q；X_{26}為I；X_{35}為E；且X_{44}為K。

【0063】 如前述實施例之化合物，其中X_0為SEQ ID NO:5，其中X_λ為S且n=1。

【0064】 一種化合物，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:4。

【0065】 一種化合物，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:10。

【0066】 一種化合物，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:11。

【0067】 一種化合物，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:12。

【0068】 一種化合物，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:13。

【0069】 一種化合物，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:14。

【0070】 一種化合物，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:15。

【0071】 一種化合物，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:16。

【0072】 一種化合物，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:17。

【0073】 一種化合物，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:18。

【0074】 一種化合物，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:19。

【0075】 一種化合物，其包含胺基酸序列SEQ ID NO:18。

【0076】 如前述實施例中任一者之化合物，其中該化合物藉由共價鍵附接至蛋白、肽或其他化學部分。如前述實施例中任一者之化合物，其中該化合物附接至以下中之一或多者：IgG Fc區、人類白蛋白、富甘胺酸肽或脂肪酸部分。如前述實施例中任一者之化合物，其中該化合物附接於IgG Fc區。如前述實施例之化合物，其中該IgG Fc區包含SEQ ID NO:6及

SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8及SEQ ID NO:9之二聚體。如前述實施例之化合物，其中X_0為SEQ ID NO:5，其中X_λ為S且n=3。

【0077】 如以上實施例中任一者之化合物，其中該化合物具有大於原生人類NRG4之HER4結合相關活性的HER4結合相關活性。

【0078】 如以上實施例中任一者之化合物，其中該化合物具有至少為原生人類NRG1之最大活性之50%的HER4結合相關活性。

【0079】 如以上實施例中任一者之化合物，其中該化合物具有至少為原生人類NRG1之最大活性之70%的HER4結合相關活性。

【0080】 如以上實施例中任一者之化合物，其中該化合物具有至少為原生人類NRG1之最大活性之90%的HER4結合相關活性。

【0081】 如以上實施例中任一者之化合物，其中該化合物不具有HER3結合相關活性。

【0082】 一種醫藥組合物，其包含以上實施例中之任一者之化合物。

【0083】 一種泵裝置，其包含以上實施例中之任一者之化合物。

【0084】 一種治療或預防有需要患者之HF的方法，其包含向該患者投與治療有效量之NRG4化合物。在一個實施例中，NRG4化合物為以上實施例中之任一者之化合物。

【0085】 一種用於治療或預防HFrEF之NRG4化合物。在一個實施例中，NRG4化合物為以上實施例中之任一者之化合物。

【0086】 一種用於製造用於治療或預防HFrEF之藥物的NRG4化合物。在一個實施例中，NRG4化合物為以上實施例中之任一者之化合物。

【0087】 在一個實施例中，化合物投與24-168小時。在一個實施例

中，投與化合物24-96小時。在一個實施例中，投與化合物24、48、72或96小時。在一個實施例中，投與化合物96小時。

【0088】 在一個實施例中，投與化合物頻率每月不超過一次。在一個實施例中，僅僅每季一次(Q3M)頻繁地投與化合物。在一個實施例中，Q3M投與化合物。在一個實施例中，Q3M投與化合物持續96小時。在一個實施例中，每六個月一次投與化合物。

【0089】 在一個實施例中，功效:投與比率為約2至約50。在一個實施例中，功效:投與比率為約20至約45。在一個實施例中，功效:投與比率為約22、約30或約45。

【0090】 在一個實施例中，治療持續至少6個月。

【0091】 在一個實施例中，治療持續至少1年。

【0092】 在一個實施例中，化合物使得LVEF顯著提高。在一個實施例中，化合物使得LVEF提高至少5%。在一個實施例中，化合物在1年治療之後使得LVEF改善5%。

【0093】 在一個實施例中，化合物使得LVESV顯著增加。在一個實施例中，化合物使得LVESV改善5%。在一個實施例中，化合物在1年治療之後使得LVESV改善5%。

【0094】 在一個實施例中，化合物導致LVEDP顯著降低。在一個實施例中，化合物在1年治療之後導致LVEDP顯著降低。

【0095】 在一個實施例中，化合物使得整體縱向應變(GLS)顯著減少。在一個實施例中，化合物使得GLS降低至少3.5%。

【0096】 在一個實施例中，化合物使得LVEDV顯著改善。

【0097】 在一個實施例中，化合物使得CV死亡及/或HF住院之風險

顯著降低。

【0098】 在一個實施例中，化合物使得CV死亡風險降低至少15%。

【0099】 在一個實施例中，化合物使得HF住院之風險降低至少15%。

【0100】 在一個實施例中，化合物使得總死亡率、MI、中風、LVAD植入或心臟移植中之一或多者風險顯著降低。

【0101】 在一個實施例中，化合物使得心臟衰竭之症狀及身體限制及/或QoL顯著改善。

【0102】 在一個實施例中，化合物不會使得：低血壓增加；腎功能惡化；電解質不平衡；肝功能障礙；腫瘤發生或持續性精液過少。

【0103】 在一個實施例中，非經腸投與化合物。

【0104】 在一個實施例中，經靜脈內、皮下或腹膜內投與化合物。

【0105】 在一個實施例中，藉由輸注泵投與化合物。

【0106】 在一個實施例中，藉由貼片泵投與化合物。

【0107】 在一個實施例中，治療有效量為提供約3至約100 nM之血清濃度之化合物的量。

【0108】 在一個實施例中，向心臟衰竭NYHA級別II-IV患者投與化合物。

【0109】 在一個實施例中，向心臟衰竭NYHA級別II-III患者投與化合物。

【0110】 在一個實施例中，化合物與一或多種用於心臟衰竭之另外療法同時或依序組合投與。在一個實施例中，心臟衰竭之一或多種另外治療選自由以下組成之群：β阻斷劑、ACE抑制劑、ARB、MRA、利尿劑、

伊伐布雷定及沙庫必曲/纈沙坦(ENTRESTO®)。在一個實施例中，化合物與SGLT2抑制劑及/或sGC活化劑同時或依序組合投與。

【0111】 在一個實施例中，所投與之NRG4化合物為本發明之NRG4化合物。

【0112】 本發明進一步藉由以下實例說明，該等實例不應理解為具限制性。

【0113】

實例化合物之製備

本發明之NRG4化合物之實例描述於以下表2中。

實例	NRG4修飾	N端AA/連接子	序列ID
1	D1G	SEQ ID NO:5其中Xλ為S且n為3	SEQ ID NO:10
2	D1G/P8E	SEQ ID NO:5其中Xλ為S且n為3	SEQ ID NO:11
3	D1G/V22Q	SEQ ID NO:5其中Xλ為S且n為3	SEQ ID NO:12
4	D1G/I26F	SEQ ID NO:5其中Xλ為S且n為3	SEQ ID NO:13
5	D1G/E35A	SEQ ID NO:5其中Xλ為S且n為3	SEQ ID NO:14
6	D1G/I26F/E44K	SEQ ID NO:5其中Xλ為S且n為3	SEQ ID NO:15
7	D1G/I26F/E44H	SEQ ID NO:5其中Xλ為S且n為3	SEQ ID NO:16
8	D1G/I26F/P8E	SEQ ID NO:5其中Xλ為S且n為3	SEQ ID NO:17
9	D1G/V22Q/E44K	SEQ ID NO:5其中Xλ為S且n為1	SEQ ID NO:18
10	D1G/V22Q/E44K	SEQ ID NO:5其中Xλ為S且n為3	SEQ ID NO:19
11	D1G/V22Q/E44K	SEQ ID NO:5其中Xλ為S且n為3	SEQ ID NO:19

【0114】 表2.實例NRG4化合物之組分。實例化合物之完整胺基酸序列(不包括任何IgG Fc區序列)提供於第四行中所列之SEQ ID NO處。實例1-8及10-11進一步包含IgG Fc區。實例1-8及10之IgG Fc區包含SEQ ID NO:6及SEQ ID NO:7之二聚體，其中上表之第三欄中所鑑別之序列的N端胺基酸與SEQ ID NO:7之C端胺基酸融合。實例11之IgG Fc區包含SEQ ID NO:8及SEQ ID NO:9之二聚體，其中上表之第三行中所鑑別之序列之N端胺基酸與SEQ ID NO:9之C端胺基酸融合。

【0115】

生物表現

在哺乳動物細胞表現系統中使用CHO GSKO細胞株產生包含Fc區之NRG4化合物之實例。GS基因剔除藉由消除內源性GS背景活性使得加強選擇嚴格度，其可允許低生產性或非生產性細胞在選擇條件下存活。編碼本發明之Fc融合突起鏈及孔鏈之基因可次選殖至用於共轉染之個別含麩醯胺酸合成酶(GS)表現質體中，或兩個鏈可次選殖至單一含GS表現質體中。或者，若需要改變任一鏈之相對表現量，則不同比率之突起鏈及孔鏈可組合為單一含GS之表現。編碼突起鏈或孔鏈之cDNA序列框內與信號肽(其可為鼠類κ前導序列)之編碼序列融合以增強所需產物分泌至細胞培養基中。表現由病毒性細胞巨大病毒(CMV)啟動子驅動。

【0116】 CHO GSKO細胞可經短暫或穩定轉染。為了穩定轉染，使用電穿孔及適當量的重組突起鏈及孔鏈表現質體轉染CHO GSKO細胞，且將經轉染細胞以足夠的細胞密度維持於懸浮培養物中。選擇經轉染細胞係藉由在無麩醯胺酸、含有25 μM甲硫胺酸磺醯亞胺(MSX)之無血清培養基中生長及在32-37℃下及5-7% CO_2下培育來實現。Fc融合分泌至來自CHO細胞之培養基中。

【0117】 使用以下任一者純化蛋白質：(1)蛋白A親和層析，隨後進行陽離子交換或疏水性相互作用層析(或其他適合之方法)；或(2)多模態層析，隨後進行疏水相互作用層析(或其他適合之方法)。

【0118】 為了以蛋白質A層析開始純化，將來自所收集之培養基的蛋白質捕捉至MabSelect SuRe蛋白質A樹脂(GE Healthcare)上。隨後用諸如磷酸鹽緩衝鹽水(PBS) (pH 7.4)之操作緩衝液或含有Tris之操作緩衝液

短暫洗滌樹脂，以移除非特異性結合材料。接著用低pH溶液(諸如20 mM乙酸/5 mM檸檬酸)自樹脂溶離蛋白質。合併含有Fc融合物之溶離份。可視需要藉由添加諸如0.1 M Tris (pH 8.0)之鹼來增大pH。在此階段，Fc融合物可用於篩選結合/活性，或必要時可藉由使用樹脂(諸如苯基瓊脂糖HP)之疏水性相互作用層析進一步純化。可使用含500 mM至0 mM梯度硫酸鈉之10 mM磷酸鈉(pH 7)在10管柱體積範圍內將Fc融合物自苯基瓊脂糖HP管柱溶離。Fc融合物可使用在PBS (pH 7.4)中等度溶離之Superdex 200管柱(GE Healthcare)藉由尺寸排阻層析進一步純化或緩衝交換為所需緩衝液。以此方式純化實例1-8及10。

【0119】 為自多模態層析開始純化，將來自所收集之培養基之蛋白質捕獲於CaptoMMC樹脂(GE Healthcare)上。接著用100 mM檸檬酸鹽，pH 5.0(「A」緩衝液)短暫洗滌樹脂，隨後用「A」緩衝液及25 mM磷酸鈉，1 M氯化鈉，pH 7.5(「B」緩衝液)之80%/20%洗滌液洗滌。接著在70%「B」緩衝液下自樹脂溶離所需蛋白質。可藉由使用樹脂(諸如苯基瓊脂糖HP(GE Healthcare))之疏水性相互作用層析進一步純化Fc融合物。可使用含800 mM至0 mM線性梯度硫酸鈉之20 mM Tris(pH 8)將Fc融合物自苯基瓊脂糖HP管柱溶離。可藉由離子交換層析法藉由使用Q瓊脂糖凝膠管柱(GE Healthcare)進一步純化Fc融合物。可使用含0 M至1 M氯化鈉梯度之20 mM Tris(pH 8)自管柱溶離Fc融合物。將溶離份合併且將緩衝交換為用於儲存之所需緩衝液。以此方式純化實例11。

【0120】

化學合成

亦可藉由使用Fmoc/t-Bu策略之固相肽合成來產生作為不包含IgG Fc

區之肽的本發明之NRG4化合物(例如上表2中之實例9)。在SymphonyX自動化肽合成器(PTI蛋白技術公司(PTI Protein Technologies Inc.))上合成肽。

【0121】 Fmoc-L-Leu-Wang樹脂(0.3-0.8毫莫耳/公克，200-400網目，Chem-Impex)用於合成肽。使用20% v/v哌啶之DMF溶液脫除保護基Fmoc。在25℃下，在DMF中使用10當量Fmoc-胺基酸、0.9 M二異丙基碳化二亞胺(DIC)及0.9 M Oxyma(1:1:1莫耳比)進行胺基酸偶合2小時。用DMF執行洗滌步驟且在每個偶合及脫除保護基步驟之後包括洗滌步驟。另外細節提供於下表3中。

步驟	溶劑/操作	混合時間	重複
1	DMF	00:01:00	2
2	25%哌啶/DMF	00:10:00	3
3	DMF	00:01:00	1
4	DMF	00:01:00	5
5	二氯甲烷	00:01:00	1
6	二氯甲烷	00:00:02	1
7	試劑(胺基酸)	00:00:01	1
8	含0.9 M Oxyma之DMF	00:00:01	1
9	含0.9 M DIC之DCM	03:00:00	1
10	DMF	00:01:00	3

表3. Fmoc-去保護及偶合方案。

【0122】 主要序列中所用之所有胺基酸為L胺基酸：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。

【0123】 在完成上文所述之肽樹脂之伸長後，移除最終Fmoc基團且

用二氯甲烷洗滌樹脂，然後使肽經受裂解。將1.5 mL水、三異丙基矽烷、苯硫基甲烷、1,2乙二硫醇(1:1:1)添加至13 mL三氟乙酸(TFA)中且將所得裂解混合物添加至樹脂中且在反應注射器中混合2.5 h。將含有裂解肽之TFA溶液轉移至含有冷乙醚之50 mL錐形小瓶中。將沈澱之肽溶液短暫離心成厚集結粒且傾析乙醚。重複乙醚沈澱兩次以洗滌殘餘混合物，隨後進行再摺疊。

【0124】 將粗肽溶解於水中且必要時添加乙腈。在乙腈及水中將粗肽濃度調節至2.5-3 mg/mL(200 mL)。接著對樣品進行直接再摺疊。藉由在0.1 M tris緩衝液(pH 8)中以比率GSSG:GSH(2 mM:1 mM)添加經氧化麩胱甘肽及經還原麩胱甘肽來製備再摺疊緩衝液。將粗肽溶液添加至再摺疊緩衝液中直至0.13-0.15 mg/mL之濃度(稀釋20倍)且將再摺疊混合物在不攪拌情況下保持在4℃下。1天之後，藉由添加至多0.2% TFA以便使pH達到3.0來淬滅再摺疊混合物。接著過濾且純化經淬滅之溶液。

【0125】 將肽溶液裝載至HPLC管柱上，且用緩衝液A平衡，然後觸發梯度。緩衝液A：含0.1% TFA之水；緩衝液B：100%乙腈。梯度：在100分鐘內10% B至25% B。流動速率：18 mL/min；在220 nm下偵測(Waters 2489偵測器)。管柱：Waters Symmetry Prep C18管柱，7 μm，19×300 mm(Waters Part #WAT066245)。藉由UV來自動觸發溶離份且使用Waters溶離份收集器III(Waters Fraction Collector III)收集溶離份。

【0126】 合併含有所需肽之經合併之溶離份且將其凍乾。

【0127】

活體外研究

用於篩選NRG4變異體以改良結合之HER4/NRG-Fc結合分析

利用結合分析來針對HER4受體進行NRG4變異Fc融合蛋白之高通量篩選，以鑑別具有增加受體活化及信號傳導之潛力的親和力驅動之變異體。用含2 μg/ml之抗His標記抗體之PBS塗佈ELISA盤以促進在用1% BSA/PBS/0.1% Tween 20(HER4 ECD，5 μg/ml)阻斷盤後之C端His標記之HER4受體細胞外結構域(ECD)構築體之標準化捕捉。將表現培養基中之飽和量未純化之NRG4-Fc變異體(以10 μg/ml開始，於1% BSA/PBS/0.1% Tween 20中連續稀釋)與捕獲之受體一起培育1小時。洗滌之後，用抗人類Fc特異性鹼性磷酸酶二次偵測試劑以色度方式偵測結合之變異體NRG4-Fc以定量結合。改變變異體結合於受體之培育時間或後續洗滌步驟之持續時間以進一步鑑別分別藉由親和力締合速率及解離速率驅動之結合變異體。此篩選製程將D1G修飾鑑別為如實例1中所包括具有高親和力及增加受體活化及信號傳導之可能性，如下表4中之資料所指示。

	實例1		WT NRG1		WT NRG4	
劑量#	劑量(μg/mL)	O.D. 405	劑量(μg/mL)	O.D. 405	劑量(μg/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

表4.結合至HER4細胞外結構域.

【0128】 如表4中所見，包括D1G修飾之實例1在此研究中以類似劑量具有與WT NRG1類似之HER4結合，且以類似劑量具有與WT NRG4相比顯著更大之HER4結合。

【0129】

CHO人類及大鼠HER2-4及HER2-3細胞株之產生

利用過度表現人類或大鼠HER受體之CHO-K1細胞的基於細胞之分析用於確定NRG4化合物之活性。CHO-K1細胞(ATCC)在DMEM-F12 3:1與5% FBS及20 mM HEPES、40 μg/mL L-脯胺酸, 1×抗生素中生長且用TripLE Express (Gibco)每2-3天以1:5裂解。細胞用編碼HER受體對(hHER2-3、hHER2-4、rHER2-3及rHER2-4)之質體DNA與Fugene 6 (Promega)根據製造商說明書轉染。包括HER2，因為此受體不結合配位體，但為用於下游信號傳導之HER受體之較佳二聚搭配物。用嘌呤黴素(Puromycin)(12 μg/mL)及潮黴素(Hygromycin)(1 mg/ml)選擇經轉染之細胞3至4週，且藉由限制稀釋選殖至96孔培養盤中獲得純系。藉由塔克曼方法(Taqman method)由HER2、HER3或HER4之適當基因表現選擇純系。藉由NRG1誘導之磷酸基(phospho)-ERK½反應確認具有適當受體表現之細胞株。使純系生長、收穫、等分至冷凍小瓶中，且接著在液氮下冷凍長期儲存。

【0130】

活體外藉由人類HER2-HER4介導之ERK 1/2磷酸化篩選分子

磷酸基-ERK1/2活性分析係用於測定NRG4化合物之效能。在量測人類HER2-HER4介導之ERK 1/2磷酸化之刺激研究中分析實例1-8及10與WT人類NRG1及/或人類NRG4相比之效能。此分析包含表現人類HER2及HER4之CHO-K1穩定株。CHO-hHER2-hHER4(純系1H6)細胞例行地在37℃、5% CO_2下在DMEM:F12(3:1)、5% FBS、40 μg/mL L-脯胺酸、10 μg/mL嘌呤黴素及1 mg/mL潮黴素中培養。用1×PBS洗細胞兩次，用

0.05%胰蛋白酶/0.53 μM EDTA解離且藉由在300×g離心10 m收集。將細胞再懸浮於維持培養基中。將30 μL之20,000個細胞/孔接種於384孔聚-D-離胺酸細胞培養盤(Greiner,目錄號781946)中。培養盤用製造商之蓋覆蓋且移至在5% CO_2、80%+濕度之37℃組織培養恆溫箱中並使其黏附。在24小時之後，自培養盤移除培養基且使用Biomek FX液體處理器以30 μL無血清饑餓培養基(具有0.1% BSA之低葡萄糖DMEM)置換。培養盤返回至恆溫箱持續24小時。

【0131】 在饑餓培養基中在透明384W盤(Greiner,目錄號781185)中將暫時表現為293F上清液之hFcNRG4變異體製備為4pt 1:8連續稀釋液(劑量範圍平均在250 pM至140000 pM之間)。自細胞培養盤中移出培養基且使用Biomek FX液體處理器將30 μL/孔製備之變異體衝壓至培養盤中。將培養盤用箔密封件密封且在室溫下在軌道式振盪器上刺激15分鐘。接著用50 μL冷PBS洗滌細胞一次。將30 μL溶解緩衝液添加至細胞中且在室溫下在軌道式振盪器上振盪10 m。

【0132】 用AlphaScreen SureFire磷酸基-ERK1/2套組(T202/Y204)(Perkin Elmer，目錄號TGRES)或AlphaLISA® SureFire® Ultra™ pERK 1/2分析套組連同AlphaScreen蛋白質A IgG偵測套組(蛋白質-A)(PerkinElmer，目錄號6760617)進行ERK 1/2磷酸化之偵測。在CHO-K1細胞溶解之後，將4 μL溶解產物轉移至有384W Biomek FX之384W Alpha Proxiplate(Perkin Elmer，目錄號6008280)中。將4 μL陽性及陰性溶解產物(Perkin Elmer，TGRES-L)作為對照添加至可用孔。用Forumlatrix Mantis將5 μL/孔接受體混合物(含有抗磷酸基-Thr202/Tyr204抗體及蛋白質A結合接受體珠粒)添加至培養盤中。將培養

盤密封，在300×g下短暫離心1分鐘且在室溫下在軌道式振盪器上培育2小時。藉由Mantis分配2 μL/孔供體混合物(含有經抗生蛋白鏈菌素塗佈之供體珠粒及針對遠端ERK1/2抗原決定基之生物素化抗體)。將培養盤密封，以300×g短暫離心1分鐘且在室溫下在軌道式振盪器上培育2小時，之後在Perkin Elmer Envision 2103多標記讀取器(HTS Alpha模式，激發時間：40 ms，總量測時間：130 ms)上讀取。

【0133】 相對於親本hFcNRG4劑量反應標繪各樣品，其一式兩份包括於XLFit中之每一培養盤上。此資料在具有四參數擬合之GraphPad Prism中繪製，且推斷出EC50效能值。結果提供於表5及表6中。

樣品	EC50 (nM)
WT NRG4	2.53
實例1	0.77 ± 0.16
實例2	2.77 ± 0.39
實例3	0.29 ± 0.01
實例4	0.53 ± 0.05
實例5	0.84 ± 0.27

表5.與WT NRG4相比，實例1-5之活性。實例1-5之資料表示具有所示標準差之兩次重複之平均值。

【0134】 如表5中之資料中所見，與其對HER4之親和力增加一致，在此研究中，相比於野生型NRG4，D1G修飾亦使在HER4及HER2之活性顯著增加，包括在包括另外胺基酸修飾之實例中。

樣品	EC50 (nM)
WT NRG1	0.3192
WT NRG4	1.2980
實例6	0.3947
實例7	0.5629
實例8	0.4033
實例10	0.2448

表6.與WT NRG1及NRG4相比，實例6-8及10之活性。

【0135】 如表6中之資料中所見，在此研究中，實例6-8及10(其中

之每一者包括D1G修飾及另外修飾)在HER4及HER2相比於WT NRG4顯示增加之活性且相比於WT NRG1顯示類似活性。

【0136】

用於測試經純化蛋白質之人類及大鼠HER2-4或HER2-3磷酸基-ERK 1/2(Thr202/Tyr204)分析

在過度表現人類或大鼠HER受體之CHO-K1細胞之情況下利用磷酸基-ERK1/2活性分析確定經純化NRG4化合物之效能及選擇性。表現人類或大鼠HER受體之CHO-K1細胞株與選擇培養基(DMEM-F12 3:1、含有5% FBS之20 mM HEPES、40 μg/mL L-脯胺酸、1×抗生素、12 μg/mL嘌呤黴素、1 mg/mL潮黴素B)一起培養。在第-1天(磷酸基-ERK1/2分析之前一天)，用PBS洗滌細胞一次，用無酶細胞解離溶液(GIBCO目錄號13151-014)分離，且再懸浮於接種培養基(含20 mM HEPES、1×抗生素、0.2% FBS之DMEM-F12 3:1)中。將細胞以每0.1 mL 10,000個細胞/孔接種於塗有聚-D-離胺酸之96孔盤中(BD目錄號354640)。細胞在組織培養恆溫箱中在37℃ 5% CO_2下培養隔夜。在第1天(pERK1/2分析當天)，在室溫下培育培養盤30分鐘。移除培養基，隨後添加稀釋於PBS-20mM HEPES-0.005% BSA中之各種濃度的50 μL配位體。原生人類NRG1及NRG4肽購自Reprokine(Tampa,FL)。刺激時間為30分鐘(hHER2-4 1H6株除外，其中15分鐘用於刺激)。在刺激結束時，移除配位體且添加70 μL溶解緩衝液(根據製造商之配方製得，Perkin Elmer目錄號ALSU-PERK-A10K)。培養盤在室溫下在板式震盪器上在350 rpm攪拌下培育10分鐘，隨後在冰上在無震盪下培育1小時。將30 μL細胞溶解物轉移至96孔白色Optiplate(Perkin Elmer目錄號6002290)以用於磷酸基-ERK1/2分析。簡

言之，將7.5 μL接受體珠粒添加至Optiplate中之30 μL溶解物中。用鋁箔覆蓋培養盤且在室溫下在板式振盪器上在350 rpm攪拌下培育1小時。接著添加7.5 μL供體珠粒，且用鋁箔覆蓋培養盤且在室溫下在板式振盪器上在350 rpm攪拌下培育2小時或在4℃下培育隔夜(在讀取前在室溫下升溫培養盤2小時)。在Envision儀器(Alpha技術相容培養盤讀取器(Alpha Technology-compatible plate reader))上獲得α信號資料。供體珠粒及接受體珠粒係根據分析方案製得。用AlphaScreen SureFire p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)分析套組(目錄號TGRES50k)或AlphaLISA® SureFire® Ultra™ p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204)分析套組(Perkin Elmer目錄號ALSU-PERK-A10K)產生所展示之資料。在兩種類型之分析中，NRG1肽之活性類似。將獲自Envision儀器之原始資料輸入至GraphPad Prism軟體(第7版)中。藉由可變斜率四參數劑量反應曲線產生EC50值。藉由相對於每培養盤原生人類NRG1之平均最大原始資料表示NRG4化合物之平均最大原始資料且乘以100來產生最大NRG1活性之%資料。資料提供於下文表7-9中。N值反映運作之獨立分析之數目。

樣品	EC50 (nM)	最大NRG1活性%
WT NRG1	0.67 ± 0.07 (N=9)	100
WT NRG4	90.09 ± 33.21 (N=8)	75 ± 4 (N=8)
實例9	0.20 ± 0.01 (N=11)	91 ± 3 (N=11)
實例10	0.16 ± 0.02 (N=8)	82 ± 4 (N=8)
實例11	0.55 ± 0.11 (N=5)	79 ± 2 (N=5)

表7.人類HER2/HER4分析.

樣品	EC50 (nM)	最大NRG1活性%
WT NRG1	0.29 ± 0.05 (N=4)	100
實例9	0.17 ± 0.02 (N=4)	87 ± 4 (N=4)
實例10	0.12 ± 0.04 (N=2)	88 ± 7 (N=2)
實例11	0.17 ± 0.06 (N=2)	96 ± 2 (N=2)

表8.大鼠HER2/HER4分析。

【0137】 如表7中所見，野生型人類NRG1肽在人類HER4及HER2

受體處展現有效活性，而野生型人類NRG4肽表現為弱部分促效劑。實例9-11展現有效活性，其中EC50值比野生型人類NRG1略微更強，且最大活性%大於野生型人類NRG4肽且接近人類NRG1之活性。如表8中所見，在大鼠HER4 HER2受體處獲得類似結果，相對於人類NRG1效能略微增加且最大活性接近人類NRG1。總之，NRG4化合物展示之實例在人類及大鼠HER4 HER2受體兩者處呈現相對於原生人類NRG4更大的磷酸基-ERK1/2活性且接近原生人類NRG1之活性。

	人類HER2/HER3分析	大鼠HER2/HER3分析
樣品	EC50 (nM)	EC50 (nM)
WT NRG1	0.83 ± 0.20 (N=6)	32 ± 14 (N=2)
WT NRG4	無活性至多1000 nM (N=1)	nd
實例9	無活性至多3000 nM (N=6)	無活性至多3000 nM(N=4)
實例10	無活性至多1000 nM(N=3)	無活性至多100 nM(N=2)
實例11	無活性至多1000 nM(N=1)	無活性至多1000 nM(N=2)

表9.人類及大鼠HER2/HER3分析

【0138】 如表9中所見，野生型人類NRG1肽在人類HER3 HER2受體處呈現有效活性，而野生型人類NRG4肽及所有實例在此受體對處不展示活性，表明對HER4 HER2受體對的不同選擇性之。總之，NRG4化合物之實例表明在HER3 HER2受體處無磷酸基-ERK1/2活性，因此展示維持野生型NRG4肽之HER4及HER2受體選擇性。

【0139】

活體內研究

實例9對大鼠MI模型中之心臟功能及結構的作用

在射出分率下降的心臟衰竭(HFrEF)之大鼠模型中進行兩次非臨床功效藥理學研究以研究實例9之血漿濃度及暴露持續時間。兩種研究均在以手術方式誘發心肌梗塞之雄性史泊格多利大鼠(Sprague Dawley rat)中量測對心臟功能及結構之作用。

【0140】 類似方法用於兩種研究。購買具有以手術方式誘發心肌梗塞之雄性史泊格多利大鼠且在整個程序中麻醉且積極地換氣。在第四與第五肋之間切開，從而顯露心臟。左冠狀動脈永久結紮。假手術動物經歷相同程序，不同之處在於在左冠狀動脈周圍置放絲質縫合線而不捆綁。所有大鼠均單獨圈養在溫度及濕度受控房間中且維持12小時亮/暗循環。在手術之後兩至三週，大鼠經歷經胸超音波心動描記術以使用Vevo 2100超音波系統測定射出分率(EF%)及左心室尺寸(LVD)。根據EF%及LVD將大鼠隨機分組成治療組。

【0141】 將EF%及LVD之量測值表示為平均值±標準誤差(SE)。用JMP®13軟體(SAS Institute, Inc.; Cary, NC)進行統計分析且將鄧奈特檢定(Dunnett's Test)用於跨越治療組之統計比較。$P<0.05$認為具有統計顯著性。

【0142】 **用於針對非臨床功效測定實例9血漿濃度之研究設計。**在10 μl/h之輸注速率下，經由Alzet®泵(Model 2ML1; Alzet® Osmotic Pumps; Cupertino, CA)連續地皮下(SC)投與實例9或媒劑(1×杜爾貝科氏磷酸鹽緩衝鹽水(Dulbecco's phosphate-buffered saline)[DPBS])持續4天。使用泵輸注，實例9投與之劑量為0.22、0.73、2.18及7.28 毫克/公斤/天。在第4天，收集血液樣品以測定血漿濃度且移除輸注泵。在開始給藥之後第七天，評估所有動物之心臟功能(EF%)及結構(LVD)。在開始給藥之後第十四天，評估媒劑治療組及兩個最高劑量組之EF%及LVD。

【0143】 **結果.** 實例9治療表明當使用滲透泵投與96小時時，心臟功能(EF%)之劑量依賴性改善(表10)。投與2.18及7.28 毫克/公斤/天之高劑量組展現經改善之心臟功能歷時開始輸注後2週(表10)。此等劑量分別

實現29.62及72.24 nM之穩態血漿濃度(表11)。與媒劑組相比，所有經治療之MI動物展現較少LVD擴張(表10)。

	射出分率					
	基線		在開始給藥之後第7天		在開始給藥之後第14天	
劑量(毫克/公斤/天)	平均值	s.e.	平均值	s.e.	平均值	s.e.
假手術，N=3	70.2	6.42	68.1	4.64	ND	ND
媒劑，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
	左心室直徑(末端舒張)					
	基線		在開始給藥之後第7天		在開始給藥之後第14天	
劑量(毫克/公斤/天)	平均值	s.e.	平均值	s.e.	平均值	s.e.
假手術，N=3	7.21	0.51	7.49	0.76	ND	ND
媒劑，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

表10. 96小時融合對HFrEF大鼠模型中之EF之作用。

縮寫：N=動物數目；ND=未測定；SE=標準誤差。*p<0.05相對於媒劑。

劑量(毫克/公斤/天)	平均值(nM)	標準偏差
0.22	2.59	0.71
0.73	9.94	1.59
2.18	29.62	4.86
7.28	72.24	13.66

表11.在輸注96小時後大鼠血漿中之暴露。

【0144】 用於針對非臨床功效測定輸注持續時間的研究設計。在10 μl/h之輸注速率下，2.18 毫克/公斤/天實例9或媒劑(DPBS)經由Alzet®泵皮下投與48、72或96 h。在指定輸注階段結束時，收集血液樣品以測定血漿濃度且移除輸注泵。在開始給藥之後第七天，評估所有動物之心臟功能

(EF%)及結構(LVD)。

【0145】 **結果.** 如表12中所見，在此研究中，實例9治療表明當使用Alzet®泵投與48至96小時的時候，心臟功能之輸注持續時間依賴性改善。72小時及96小時之實例9輸注使得在開始給藥之後第7天EF顯著改善。與媒劑組相比，所有經治療之MI動物展示較少LVD擴張。

	射出分率			
	基線		在開始給藥之後第7天	
持續時間(小時)	平均值	s.e.	平均值	s.e.
媒劑，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
	左心室直徑(末端舒張)			
	基線		在開始給藥之後第7天	
持續時間(小時)	平均值	s.e.	平均值	s.e.
媒劑，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

表12.實例9輸注多個持續時間對心臟功能之作用。縮寫：N=動物數目；ND=未測定；SE=標準誤差。*p<0.05相對於媒劑。

輸注時間(小時)	平均值(nM)	標準偏差
48	40.13	6.37
72	47.28	17.85
96	31.42	9.86

表13.在實例9輸注之後在大鼠心肌梗塞模型血漿中之暴露。

【0146】 非臨床資料顯示當實例9之血漿濃度維持在3至100 nM持續72至96小時的時候，HFrEF之大鼠模型中的LVEF改善。

【0147】

實例10對大鼠MI模型中之心臟功能及結構的作用

在射出分率下降的心臟衰竭(HFrEF)之大鼠模型中進行非臨床功效藥理學研究以評估在卡托普利治療(captopril treatment)、實例10治療或組

合治療之後的心臟功能及結構變化。

【0148】 **方法.** 購買具有以手術方式誘發心肌梗塞之雄性史泊格多利大鼠且在整個程序中麻醉且積極地換氣。在第四與第五肋之間切開，從而顯露心臟。左冠狀動脈永久結紮。所有大鼠均單獨圈養在溫度及濕度受控房間中且維持12小時亮/暗循環。在手術之後兩至三週，大鼠經歷經胸超音波心動描記術以使用Vevo 2100超音波系統測定射出分率(EF%)及左心室尺寸(LVD)。根據EF%及LVD將大鼠隨機分組成治療組。

【0149】 將EF%及LVD之量測值表示為平均值±標準誤差(SE)。用JMP®13軟體(SAS Institute, Inc.; Cary, NC)進行統計分析且將鄧奈特檢定(Dunnett's Test)用於跨越治療組之統計比較。$P<0.05$認為具有統計顯著性。

【0150】 **研究設計.**在MI手術之後三週，根據EF%及LVD將動物隨機分成2個治療組(安慰劑或卡托普利、2 g/L於飲用水中，隨意)。在給藥開始之後第三週及第四週，藉由經胸超音波心動描記術評估心臟功能(EF%)及結構(LVD)。基於心臟功能(EF%)及結構(LVD)將動物進一步隨機分為另外組，即下列各組：安慰劑、實例10、卡托普利及實例10+卡托普利。實例10組中之動物在第4週在第2次隨機化之後接受單次注射。在第5週及第6週評估心臟功能(EF%)及結構(LVD)。

【0151】 **結果.** 結果提供於表14中。

	射出分率											
	基線		第3週			第4週		第5週		第6週		
	AVG	s.e.	AVG	s.e.		AVG	s.e.	平均	s.e.	AVG	s.e.	
媒劑	38.2	1.42	32.8	1.55	媒劑	33.4	2.49	30.0	2.70	29.9	2.43	
卡托普利	39.1	1.30	38.4	2.43	卡托普利	36.1	2.66	36.2	3.23	34.6	3.09	
					實例10	33.3	2.06	46.5*	3.68	46.0*	2.46	
					實例10 +	35.8	1.96	47.3*	1.97	46.7*	2.45	

					卡托普利						
	左心室直徑(末端舒張)										
	基線		第3週			第4週		第5週		第6週	
	AVG	s.e.	AVG	s.e.		AVG	s.e.	AVG	s.e.	AVG	s.e.
媒劑	8.75	0.25	9.00	0.18	媒劑	9.25	0.44	10.16	0.46	9.92	0.40
卡托普利	8.66	0.16	8.57	0.14	卡托普利	8.64	0.29	8.64*	0.24	8.71*	0.21
					實例10	9.33	0.24	9.35	0.37	9.01	0.25
					實例10＋卡托普利	8.82	0.12	8.51*	0.23	8.41*	0.28

表14. 卡托普利、單次注射實例10或組合療法對射出分率下降的心臟衰竭之大鼠模型中之EF之作用。縮寫：AVG=平均值。s.e.=標準誤差。*p<0.05相對於媒劑。

【0152】 如表14中所見，雖然卡托普利治療減緩在6週治療過程中之心臟功能減退(在統計學上不顯著)，但實例10治療顯著改善心臟功能(EF%)且減少單一治療後之LV擴張。

【0153】

實例11對大鼠MI模型中之心臟功能及結構的作用

在射出分率下降的心臟衰竭(HFrEF)之大鼠模型中進行非臨床功效藥理學研究以鑑別實例11之劑量反應關係。

【0154】 **方法.** 自Charles River購買具有以手術方式誘發心肌梗塞之雄性史泊格多利大鼠。簡言之，在整個程序中將大鼠麻醉且積極地換氣。在第四與第五肋之間切開，從而顯露心臟。左冠狀動脈永久結紮。假手術動物經歷相同程序，不同之處在於在左冠狀動脈周圍置放絲質縫合線而不捆綁。所有大鼠均單獨圈養在溫度及濕度受控房間中且維持12小時亮/暗循環。在手術之後第三週，大鼠經歷經胸超音波心動描記術以使用Vevo 2100超音波系統測定射出分率(EF%)及左心室尺寸(LVD)。根據EF%及LVD將大鼠隨機分組成治療組。

【0155】 將EF%及LVD之量測值表示為平均值±標準誤差(SE)。用JMP®13軟體(SAS Institute, Inc.; Cary, NC)進行統計分析且將鄧奈特檢定(Dunnett's Test)用於跨越治療組之統計比較。P<0.05認為具有統計顯著性。

【0156】 **研究設計.** 在MI手術之後兩至三週，將動物分配至治療組且用單次注射媒劑(DPBS)或3種劑量(0.3、1、3 毫克/公斤)實例11中之一者治療。在開始給藥之後第7天、第14天及第21天，評估所有動物之心臟功能(EF%)及結構(LVD)。

【0157】 結果.結果提供於表15中。

	射出分率							
	基線		在給藥之後第7天		在給藥之後第14天		在給藥之後第21天	
劑量	平均值	s.e.	平均值	s.e.	平均值	s.e.	平均值	s.e.
假手術，N=5	73.7	2.24	72.5	1.76	71.8	0.81	71.9	3.60
媒劑，N=8	45.0	1.50	41.2	2.90	38.4	1.98	37.8	1.98
0.3 毫克/公斤, N=8	45.4	2.46	50.1*	3.22	42.6	1.43	36.4	1.43
1 毫克/公斤, N=8	46.6	1.86	52.4*	2.61	42.2	2.77	39.7	2.77
3 毫克/公斤, N=8	45.8	1.48	54.7*	2.11	54.0*	2.49	39.6	2.49

表15.實例11對射出分率下降之心臟衰竭大鼠模型中之EF之作用。縮寫：N=動物數目；s.e.=標準誤差。*p<0.05相對於媒劑。

【0158】 如表15中所見，實例11治療展現心臟功能(EF%)之劑量依賴性改善。高劑量組展現經改善之心臟功能歷時治療後2週。在研究過程期間，各組未觀測到LVD擴張差異(資料未示出)。

【0159】

實例9-11對心臟毒性之作用

在大鼠及/或食蟹獼猴中對實例9-11進行毒理學研究。以0.3 毫克/公

斤之單次SC注射向大鼠投與實例10，其導致可偵測血漿濃度長於168小時。處死大鼠，且組織之檢查揭露心臟退化及壞死。以30 毫克/公斤之單次SC注射向大鼠投與實例11；血漿濃度在96小時的時候不可偵測。處死大鼠，且組織之檢查未揭露心臟退化及/或壞死之跡象。藉由SC快速注射以單次3 毫克/公斤劑量向雄性及雌性猴投與實例11。相比於其在大鼠中之藥物動力學，猴中之單次注射導致耗時長於168小時以清除的可偵測之血漿濃度。處死猴，且組織之檢查揭露心臟退化及壞死。藉由皮下(SC)植入之泵以產生在3-300 nM範圍內之血漿濃度之劑量投與實例9歷時96-168小時，實例9在大鼠中展示SC投與之後小於一小時的半衰期。處死大鼠，且組織之檢查未揭露心臟退化及/或壞死之跡象。藉由以手術方式置放SC或靜脈內(IV)導管以產生在30-1000 nM範圍內之血漿濃度的劑量向雄性及雌性猴投與實例9歷時96小時，實例9在猴中在SC投與之後具有小於5小時之半衰期。處死猴，且組織之檢查未揭露心臟毒性及/或壞死之跡象。此等資料表明可投與NRG4化合物，而藉由限制暴露於NRG4化合物之持續時間不產生心臟毒性。

【0160】

序列

SEQ ID NO:1 - 人類NRG4

DHEEPCGPSH KSFCLNGGLC YVIPTIPSPF CRCVENYTGA RCEEVFL

SEQ ID NO:2 - NRG4化合物

X_0GHEEPCGX_8SHKSFCLNGGLCYX_{22}IPTX_{26}PSPFCRCVX_{35}NYTGARCEX_{44}VFL

其中：

X_0選自由以下組成之群：T、PT、MPT、S、GS、GGS、GGGS及

$(GGGGX_\lambda)_n$，其中X_λ為Q、A、E或S且n=1-5(SEQ ID NO:5)，或不存在；

X_8為E或P；

X_{22}為Q或V；

X_{26}為F或I；

X_{35}為E或A；且

X_{44}為H、K或E。

如下表現之SEQ ID NO:3人類NRG4全序列

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

SEQ ID NO:4 - NRG4化合物

GHEEPCGPSH KSFCLNGGLC YQIPTIPSPF CRCVENYTGA RCEKVFL

SEQ ID NO:5 - 富甘胺酸肽或連接子

$(GGGGX_\lambda)_n$

其中：

X_λ為Q、A、E或S；且

n為1-5。

SEQ ID NO:6 - IgG Fc區

ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG

SEQ ID NO:7 -IgG Fc區

ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG

SEQ ID NO:8 -IgG Fc區

ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK
TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNAYTQKSLSL
SPG

SEQ ID NO:9 -IgG Fc區

ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK
TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNAYTQKSLSL
SPG

SEQ ID NO:10 - NRG4化合物

GGGGSGGGGSGGGGS GHEEPCGPSH KSFCLNGGLC YVIPTIPSPF
CRCVENYTGA RCEEVFL

SEQ ID NO:11 - NRG4化合物

GGGGSGGGGSGGGGS GHEEPCGESH KSFCLNGGLC YVIPTIPSPF
CRCVENYTGA RCEEVFL

SEQ ID NO:12 - NRG4化合物

GGGGSGGGGSGGGGS GHEEPCGPSH KSFCLNGGLC YQIPTIPSPF
CRCVENYTGA RCEEVFL

SEQ ID NO:13 - NRG4化合物

GGGGSGGGGSGGGGS GHEEPCGPSH KSFCLNGGLC YVIPTFPSPF
CRCVENYTGA RCEEVFL

SEQ ID NO:14 - NRG4化合物

GGGGSGGGGSGGGGSGHEEPCGPSH KSFCLNGGLCYVIPTIPSPFCRCVANYTGA
RCEEVFL

SEQ ID NO:15 - NRG4化合物

GGGGSGGGGSGGGGSGHEEPCGPSHKSFCLNGGLCYVIPTFPSPFCRCVENYTGA
RCEKVFL

SEQ ID NO:16 - NRG4化合物

GGGGSGGGGSGGGGSGHEEPCGPSHKSFCLNGGLCYVIPTFPSPFCRCVENYTGA
RCEHVFL

SEQ ID NO:17 - NRG4化合物

GGGGSGGGGSGGGGSGHEEPCGESHKSFCLNGGLCYVIPTFPSPFCRCVENYTGA
RCEEVFL

SEQ ID NO:18 - NRG4化合物

GGGGSGHEEPCGPSHKSFCLNGGLCYQIPTIPSPFCRCVENYTGARCEKVFL

SEQ ID NO:19 - NRG4化合物

GGGGSGGGGSGGGGSGHEEPCGPSHKSFCLNGGLCYQIPTIPSPFCRCVENYTGA
RCEKVFL

SEQ ID NO:20

GGGS

【序列表】

<110> 美商美國禮來大藥廠(Eli Lilly and Company)

<120> 神經調節蛋白-4(NEUREGULIN-4)化合物及使用方法

<130> X22153

<150> US 62/827,386
<151> 2019-04-01

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 47
<212> PRT
<213> 智人

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> 位置1處之Xaa選自由以下組成之群：T、PT、
MPT、S、GS、GGS、GGGS及(GGGGXλ)n，其中Xλ爲Q、
A、E或S且n=1-5 (SEQ ID NO:5)，或不存在

<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(9)
<223> 位置9處之Xaa爲E或P

<220>
<221> VARIANT
<222> (23)..(23)
<223> 位置23處之Xaa爲Q或V

<220>
<221> VARIANT
<222> (27)..(27)
<223> 位置27處之Xaa爲F或I

<220>
<221> VARIANT
<222> (36)..(36)
<223> 位置36處之Xaa爲E或A

<220>
<221> VARIANT
<222> (45)..(45)
<223> 位置45處之Xaa爲H、K或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> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(5)
<223> SEQ ID NO:5進一步表示爲(GGGGXλ)n，其中：
Xλ爲Q、A、E或S；且n爲1-5。

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> 位置5處之Xaa爲Xλ，其中Xλ爲Q、A、E或S

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Xaa
1 5

<210> 6
<211> 221
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<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> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<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> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 20

Gly Gly Gly Ser
1

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種神經調節蛋白4(NRG4)化合物，其包含下式：

X_0GHEEPCGX_8SHKSFCLNGGLCYX_{22}IPTX_{26}PSPFCRCVX_{35}NYT GARCEX_{44}VFL

其中：

X_0係$(GGGGX_\lambda)_n$，其中X_λ為S且n=1至5(SEQ ID NO:5)，或不存在；

X_8為E或P；

X_{22}為Q或V；

X_{26}為F或I；

X_{35}為E或A；且

X_{44}為H、K或E

(SEQ ID NO:2)，

其中該NRG4化合物可選擇性結合至HER4而不結合至HER3。

【請求項2】

如請求項1之NRG4化合物，其中X_8為P；X_{22}為V；X_{26}為I；X_{35}為E；且X_{44}為E。

【請求項3】

如請求項1之NRG4化合物，其中X_8為E；X_{22}為V；X_{26}為I；X_{35}為E；且X_{44}為E。

【請求項4】

如請求項1之NRG4化合物，其中X_8為P；X_{22}為Q；X_{26}為I；X_{35}為

E；且X_{44}為E。

【請求項5】

如請求項1之NRG4化合物，其中X_8為P；X_{22}為V；X_{26}為F；X_{35}為E；且X_{44}為E。

【請求項6】

如請求項1之NRG4化合物，其中X_8為P；X_{22}為V；X_{26}為I；X_{35}為A；且X_{44}為H或E。

【請求項7】

如請求項1之NRG4化合物，其中X_8為P；X_{22}為V；X_{26}為F；X_{35}為E；且X_{44}為K。

【請求項8】

如請求項1之NRG4化合物，其中X_8為P；X_{22}為V；X_{26}為F；X_{35}為E；且X_{44}為H。

【請求項9】

如請求項1之NRG4化合物，其中X_8為E；X_{22}為V；X_{26}為F；X_{35}為E；且X_{44}為E。

【請求項10】

如請求項1之NRG4化合物，其中X_8為P；X_{22}為Q；X_{26}為I；X_{35}為E；且X_{44}為K。

【請求項11】

如請求項1至10中任一項之NRG4化合物，其進一步包含IgG Fc區。

【請求項12】

如請求項1之NRG4化合物，其中X_0為SEQ ID NO:5，其中X_λ為S且

n=3，且其中該IgG Fc區包含SEQ ID NO:6與SEQ ID NO:7之二聚體，其中X_0之N端胺基酸與SEQ ID NO:7之C端胺基酸融合。

【請求項13】

如請求項11之NRG4化合物，其中X_0為SEQ ID NO:5，其中X_λ為S且n=3，且其中該IgG Fc區包含SEQ ID NO:8與SEQ ID NO:9之二聚體，其中X_0之該N端胺基酸與SEQ ID NO:9之C端胺基酸融合。

【請求項14】

如請求項1至10中任一項之NRG4化合物，其中X_0為SEQ ID NO:5，其中X_λ為S且n=1。

【請求項15】

如請求項1至10中任一項之NRG4化合物，其中該化合物包含選自由以下組成之群的胺基酸序列：SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18及SEQ ID NO:19。

【請求項16】

一種NRG4化合物，其由胺基酸序列SEQ ID NO:18組成。

【請求項17】

如請求項1之NRG4化合物，其中該化合物具有HER4結合相關活性，其大於原生人類NRG4之HER4結合相關活性且為原生人類NRG1之最大活性的至少70%。

【請求項18】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至17中任一項之NRG4化合物及

醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑。

【請求項19】

一種泵裝置，其包含如請求項1至17中任一項之NRG4化合物。

【請求項20】

一種如請求項1至17中任一項之NRG4化合物之用途，其係用於製造用於治療或預防射出分率下降之心臟衰竭(HFrEF)之醫藥品。

【請求項21】

如請求項20之用途，其中投與之該NRG4化合物的量足以提供該NRG4化合物之治療有效血清濃度24至96小時。

【請求項22】

如請求項21之用途，其中功效:投與比率在約2至約50範圍內。

【請求項23】

如請求項20至22中任一項之用途，其中該NRG4化合物藉由連續皮下輸注每季一次(Q3M)投與持續24至96小時。

【請求項24】

如請求項20至22中任一項之用途，其中該NRG4化合物係藉由貼片泵投與。

【請求項25】

如請求項20至22中任一項之用途，其中該治療持續至少1年。

【請求項26】

如請求項20至22中任一項之用途，其中該治療使得左心室射出分率(LVEF)顯著提高。

【請求項27】

如請求項20至22中任一項之用途，其中該治療使得整體縱向應變(GLS)顯著降低。

【請求項28】

如請求項20至22中任一項之用途，其中該治療使得左心室舒張末期容積(LVEDV)顯著改良。

【請求項29】

如請求項20至22中任一項之用途，其中該治療使得心血管(CV)死亡之風險顯著降低。

【請求項30】

如請求項20至22中任一項之用途，其中該治療使得在住院時心臟衰竭(HF)相關風險顯著降低。

【請求項31】

如請求項20至22中任一項之用途，其中該患者患有紐約心臟協會(NYHA)級別 II或III之心臟衰竭。

【請求項32】

如請求項20之用途，其中該NRG4化合物係投與48至96小時。