

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290115** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.04.14

(51) Int. Cl. **C07K 14/64** (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.07.31

(54) АНАЛОГИ РЕЛАКСИНА И СПОСОБЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

(31) 62/880,968; 62/970,005

(32) 2019.07.31; 2020.02.04

(33) US

(86) PCT/US2020/044462

(87) WO 2021/022139 2021.02.04

(71) Заявитель:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:

**Ли Стейси Линн, Вердино Петра, Ван
Сяоцзюнь (US)**

(74) Представитель:

**Парамонова К.В., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Костюшенкова
М.Ю., Строкова О.В., Прищепный
С.В., Джермакян Р.В. (RU)**

(57) Описаны аналоги релаксина (RLN), включая модификации, которые увеличивают период полувыведения по сравнению с нативным RLN человека, которые поддерживают селективность в отношении рецептора RXFP1 и которые обеспечивают стабильность in vitro и in vivo, улучшая лекарственные свойства препарата и снижая иммуногенность. Также описаны фармацевтические композиции, которые содержат один или более аналогов RLN, описанных в данном документе, в фармацевтически приемлемом носителе. Также описаны способы получения и использования аналогов RLN, в особенности для лечения патологических состояний, заболеваний или нарушений сердечно-сосудистой системы, легких и/или почек.

A1

202290115

202290115

A1

АНАЛОГИ РЕЛАКСИНА И СПОСОБЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

[0001] Раскрытие в целом относится к биологии и медицине и, в частности, к аналогам релаксина (RLN - relaxin), в особенности к одноцепочечным аналогам RLN пролонгированного действия, которые могут связываться с рецептором пептидов RLN/инсулиноподобного семейства (RXFP - RLN/insulin-like family peptide), таким как рецептор RXFP1, тем самым действуя как агонисты рецептора RXFP. Кроме того, раскрытие относится к композициям, содержащим данные аналоги, и их использованию для лечения патологических состояний, заболеваний или нарушений сердечно-сосудистой системы, легких и/или почек.

[0002] Релаксины (RLN) являются частью суперсемейства инсулинов и у человека включают семь пептидов с высоким структурным сходством, но низким сходством последовательностей – RLN1 (H1RLX, RLXH1 или H1), RLN2 (H2RLX, RLXH2 или H2), RLN3 (RXN3, ZINS4 или H3), инсулиноподобный (INSL - insulin-like) пептид 3 (INSL3), INSL4, INSL5 и INSL6. Особый интерес в данном документе представляет RLN2, который представляет собой гетеродимер из двух пептидных цепей из двадцати четырех и двадцати девяти аминокислот (А-цепь и В-цепь), соответственно, связанных двумя дисульфидными связями, при этом А-цепь дополнительно имеет одну внутримолекулярную дисульфидную связь (см. Schwabe & McDonald (1977) *Science* 197:914-915). RLN2 образуется из его прогормона, прорелаксина, путем отщепления от него С-пептида.

[0003] Физиологически RLN2 обладает разнообразным набором функций, которые регулируют адаптацию сердечно-сосудистой системы, печени, нервной системы, поджелудочной железы, легких и почек, такими как сосудорасширяющие, антифиброзные и ангиогенные воздействия, хотя изначально он был описан как гормон беременности. Передача сигналов RLN2 происходит через два разных класса рецепторов, связанных с G-белком (GPCR), а именно, GPCR, содержащие богатые лейцином повторы, LGR7 и LGR8, которые теперь называются рецепторами RXFP1 и RXFP2, соответственно. Два других рецептора в этом семействе включают рецепторы RXFP3 и RXFP4. RLN2 имеет короткий период полувыведения ($t_{1/2}$), что создает сложности при использовании его в качестве терапевтического агента. Фактически, $t_{1/2}$ нативного RLN2 *in vivo* составляет минуты. Следовательно, практикующие врачи вводят RLN2 путем непрерывной внутривенной инфузии, что часто приводит к неудобствам для людей, получающих соединение RLN, и к краткосрочной эффективности.

[0004] Существует ряд аналогов RLN2 с улучшенным $t_{1/2}$. Например, публикация международной заявки на патент № WO 2018/148419 описывает аналоги, которые включают ненативный аминокислотный остаток, такой как пара-ацетил-фенилаланин, к которому могут быть присоединены линкеры, полимеры и/или фармакокинетические усилители для улучшения $t_{1/2}$. Публикация международной заявки на патент № WO 2018/138170 описывает аналоги, которые представляют собой слияния А-цепи и В-цепи, содержащие линкер из, по меньшей мере, пятнадцати аминокислот и фрагмент, увеличивающий период полувыведения, для улучшения $t_{1/2}$. Публикация международной заявки на патент № WO 2017/201340 описывает аналоги, которые представляют собой слияния А-цепи и В-цепи, имеющие фрагмент вариабельной области легкой цепи для улучшения $t_{1/2}$. Публикация международной заявки на патент № WO 2015/067791 описывает аналоги, которые представляют собой пролекарственные препараты, связанные с носителем, в особенности носителями на основе ПЭГ, для улучшения $t_{1/2}$ (см. также WO 2012/024452 для дополнительных ПЭГ-связанных аналогов). Публикация международной заявки на патент № WO 2014/102179 описывает аналоги, которые представляют собой слияния А-цепи и В-цепи, содержащие Fc-фрагмент IgG2 или IgG4 для улучшения $t_{1/2}$. Публикация международной заявки на патент № WO 2013/004607 описывает аналоги, которые представляют собой слияния А-цепи и В-цепи, содержащие линкер из, по меньшей мере, пяти аминокислот, но менее пятнадцати аминокислот для улучшения $t_{1/2}$, или которые представляют собой слияния А-цепи и В-цепи, содержащие Fc-домен антител для улучшения $t_{1/2}$.

[0005] Ввиду увеличения понимания различных физиологических функций RLN, остается потребность в аналогах RLN пролонгированного действия, имеющих улучшенный $t_{1/2}$.

[0006] Для решения этой проблемы, в описании сначала описаны одноцепочечные аналоги RLN, имеющие основную активность в отношении рецептора RXFP1 (*m.e.* действуют как агонисты рецептора RXFP1). Такие агонисты рецептора RXFP1 содержат основную структуру от amino-конца (N-конца) до карбокси-конца (C-конца):

VHH-L₁-A-L₂-B,

VHH-L₁-B-L₂-A,

A-L₂-B-L₁-VHH или

B-L₂-A-L₁-VHH,

где VHH представляет собой фрагмент, который может действовать как фармакокинетический усилитель, А представляет собой А-цепь RLN, В представляет

собой В-цепь RLN, L_1 представляет собой первый линкер и L_2 представляет собой второй линкер.

[0007] В некоторых случаях фрагмент VHH может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, 11, 12 или 13, в особенности SEQ ID NO:10 или 12. В других случаях фрагмент VHH может содержать одно или более добавлений, делеций, вставок или замен, так что фрагмент VHH имеет аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с любой из последовательностей SEQ ID NO:10, 11, 12 или 13 (*см., например*, SEQ ID NO: 45-66).

[0008] В некоторых случаях А-цепь может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, 5 или 8, в особенности последовательность SEQ ID NO:5. В других случаях А-цепь может содержать одно или более добавлений, делеций, вставок или замен, так что А-цепь имеет аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с любой из последовательностей SEQ ID NO:2, 5 или 8. Например, А-цепь может представлять собой последовательность des1-4 SEQ ID NO:5.

[0009] В некоторых случаях В-цепь может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, 6 или 9, в особенности SEQ ID NO:6. В других случаях В-цепь может содержать одно или более добавлений, делеций, вставок или замен, так что В-цепь имеет аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с любой из последовательностей SEQ ID NO:3, 6 или 9. Например, В-цепь может представлять собой последовательность des1 SEQ ID NO:6.

[0010] В некоторых случаях L_1 может иметь аминокислотную последовательность $(GGGGQ)_n$ (SEQ ID NO:14), $(GGGQ)_n$ (SEQ ID NO:15), $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO:16), $(PGPQ)_n$ (SEQ ID NO:17) или $(PGPA)_n$ (SEQ ID NO:18), где n может быть от 1 до 10, в особенности от около 5 до около 8. В других случаях L_1 может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19, 20 или 21. В других случаях L_1 может содержать одно или более добавлений, делеций, вставок или замен, так что L_1 имеет аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с любой из последовательностей SEQ ID NO:14 - 21.

[0011] В некоторых случаях L_2 может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22, 23 или 67. В других случаях L_2 может содержать одно или более добавлений, делеций, вставок или замен.

[0012] В некоторых случаях аналоги RLN могут иметь аминокислотную последовательность, которая содержит VHH с последовательностью SEQ ID NO:10, 11, 12 или 13; А-цепь с последовательностью SEQ ID NO:2, 5 или 8; В-цепь с последовательностью SEQ ID NO:3, 6 или 9; L₁ с последовательностью SEQ ID NO:19, 20 или 21; и L₂ с последовательностью SEQ ID NO: 22, 23 или 67. Альтернативно, аналоги RLN могут иметь аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с аминокислотной последовательностью, которая содержит аминокислотную последовательность, содержащую VHH с последовательностью SEQ ID NO:10, 11, 12 или 13; А-цепь с последовательностью SEQ ID NO:2, 5 или 8; В-цепь с последовательностью SEQ ID NO:3, 6 или 9; L₁ с последовательностью SEQ ID NO:19, 20 или 21; и L₂ с последовательностью SEQ ID NO:22, 23 или 67.

[0013] В конкретных случаях аналоги RLN могут иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 или 39, в особенности SEQ ID NO:26, 27, 30, 31, 34 или 35. Альтернативно, аналоги RLN могут иметь аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 или 39, в особенности SEQ ID NO:26, 27, 30, 31, 34 или 35.

[0014] В некоторых случаях аналоги RLN обладают аффинностью связывания с рецептором RXFP1, сравнимой с аффинностью связывания нативного RLN2 человека (SEQ ID NO: 5 и 6). В других случаях аналоги RLN обладают аффинностью связывания с рецептором RXFP1, которая выше, чем аффинность нативного RLN2 человека (SEQ ID NO:5 и 6). В других случаях аналоги RLN обладают аффинностью связывания с рецептором RXFP1, которая меньше, чем у нативного RLN2 человека (SEQ ID NO:5 и 6).

[0015] В некоторых случаях аналоги RLN имеют $t_{1/2}$, который длиннее, чем у нативного RLN2 человека (SEQ ID NO:5 и 6), включая от около 20 дней до около 30 дней дольше при введении человеку.

[0016] Вышеуказанные композиции альтернативно могут представлять собой последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие аминокислотные последовательности, описанные в данном документе, а также векторы и клетки-хозяева, которые содержат такие последовательности, для экспрессии аналогов RLN, описанных в данном документе.

[0017] Во-вторых, описаны фармацевтические композиции, которые содержат, по меньшей мере, один аналог RLN, описанный в данном документе, или его

фармацевтически приемлемую соль (*например*, соли трифторацетата, соли ацетата или соли гидрохлорида) и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых случаях фармацевтически приемлемый носитель представляет собой буфер, такой как, например, физиологический раствор, забуференный фосфатом физиологический раствор, забуференный цитратом физиологический раствор или забуференный гистидином физиологический раствор. В некоторых случаях буфер представляет собой гистидин, гистидиновый буфер или забуференный гистидином физиологический раствор. В других случаях фармацевтические композиции могут дополнительно включать носители, разбавители и/или эксципиенты.

[0018] Более того, фармацевтические композиции могут включать, по меньшей мере, один дополнительный терапевтический агент, такой как, например, агент, используемый в качестве стандарта для лечения патологического состояния, заболевания или нарушения сердечно-сосудистой системы, легких и/или почек. В некоторых случаях, по меньшей мере, один дополнительный терапевтический агент может представлять собой антикоагулянт, ингибитор ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), блокатор рецепторов ангиотензина-II (БРА, ARB - angiotensin II receptor blocker), ингибитор БРА/неприлизина (ARNI - angiotensin receptor II blocker - neprilysin inhibitor), β -блокатор, диуретик, дигиталис, дигоксин, гидралазин/изорбид динитрат, антагонист минералокортикоидных рецепторов (АМКР; или антагонист альдостерона), ингибитор натрийзависимого переносчика глюкозы 2 типа (SGLT2), статин и/или антигликемический агент.

[0019] В-третьих, в данном документе описаны способы использования аналогов RLN, в особенности для использования аналогов RLN для лечения патологических состояний, заболеваний или нарушений сердечно-сосудистой системы, легких и/или почек. Способы включают, по меньшей мере, этап введения индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества, по меньшей мере, одного аналога RLN, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

[0020] В некоторых случаях аналог RLN можно вводить любым стандартным способом введения, таким как, например, внутримышечно, внутривенно, парентерально, подкожно или трансдермально. В некоторых случаях аналог RLN вводят подкожно (п/к), внутримышечно (в/м) или внутривенно (в/в). В конкретных случаях аналог RLN можно вводить индивидууму п/к или в/в.

[0021] Аналогичным образом, и в некоторых случаях, аналог RLN можно вводить ежедневно, через день, три раза в неделю, два раза в неделю, один раз в неделю (*т. е.* еженедельно), один раз в две недели (*т. е.* каждые две недели), один раз в месяц (*т. е.*

ежемесячно), один раз в два месяца (*т. е.* каждые два месяца) или даже каждые три месяца. В некоторых случаях аналог RLN может вводиться п/к через день, п/к три раза в неделю, п/к два раза в неделю, п/к один раз в неделю, п/к каждые две недели или п/к один раз в месяц. В конкретных случаях аналог RLN вводят п/к один раз в неделю (1 раз/нед., QW).

[0022] Альтернативно, аналог RLN можно вводить индивидууму в/в. Как указано выше, аналог RLN можно вводить ежедневно, через день, три раза в неделю, два раза в неделю, один раз в неделю (*т. е.* еженедельно), раз в две недели (*т. е.* каждые две недели) или ежемесячно. В некоторых случаях аналог RLN может вводиться в/в через день, в/в три раза в неделю, в/в два раза в неделю, в/в один раз в неделю, в/в каждые две недели или в/в один раз в месяц. В конкретных случаях аналог РНЛ вводят в/в один раз в неделю.

[0023] Способы также могут включать этап введения аналога RLN в комбинации с эффективным количеством, по меньшей мере, одного дополнительного терапевтического агента. Вкратце, стандарт лечения многих патологических состояний/заболеваний/нарушений, описанных в данном документе, включает антикоагулянт, ингибитор АПФ, БРА, ARNI, β -блокатор, диуретик, дигиталис, дигоксин, гидралазин/изосорбит динитрат, АМКР или другой антагонист альдостерона, ингибитор SGLT2, статин и/или антигликемический агент, а также другие терапевтические агенты для контроля сопутствующих заболеваний, включая, но не ограничиваясь этим, высокий уровень холестерина, высокое кровяное давление, мерцательную аритмию и диабет. В некоторых случаях дополнительный терапевтический агент можно вводить одновременно, отдельно или последовательно с аналогом RLN.

[0024] Например, дополнительный терапевтический агент можно вводить с такой же частотой, что и аналог RLN (*т. е.* через день, два раза в неделю, еженедельно или даже ежемесячно). В других случаях дополнительный терапевтический агент можно вводить с частотой, отличной от частоты введения аналога RLN. В некоторых случаях дополнительный терапевтический агент можно вводить п/к или в/в. В других случаях аналог RLN вводят п/к, а дополнительный терапевтический агент можно вводить перорально или в/в. Альтернативно аналог RLN вводят в/в, а дополнительный терапевтический агент вводят п/к.

[0025] В некоторых случаях нуждающийся индивидуум представляет собой диабетика, гипертоника с нарушением функции почек и/или страдает ожирением.

[0026] Способы также могут включать такие этапы, как измерение или получение данных о кровяном давлении и сравнение таких полученных значений с одним или более

исходными значениями или ранее полученными значениями для оценки эффективности лечения/терапии.

[0027] Способы также можно комбинировать с диетой и физическими упражнениями и/или можно комбинировать с дополнительными терапевтическими агентами, отличными от тех, которые обсуждались выше.

[0028] В-четвертых, в данном документе описаны применения, которые включают, по меньшей мере, один из аналогов RLN, описанных в данном документе. Например, аналоги RLN, описанные в данном документе, могут быть предложены для использования в терапии, в особенности при лечении патологических состояний, заболеваний или нарушений сердечно-сосудистой системы, легких и/или почек. Аналоги RLN необязательно можно вводить одновременно, отдельно или последовательно (*т. е.* в комбинации) с, по меньшей мере, одним дополнительным терапевтическим агентом. Аналогичным образом, использование аналогов RLN, описанных в данном документе, предложено при производстве лекарственного средства для лечения патологических состояний, заболеваний или нарушений сердечно-сосудистой системы, легких и/или почек, при этом лекарственное средство необязательно может дополнительно включать один или более дополнительных терапевтических агентов, как указано выше.

[0029] В-пятых, в данном документе предложено соединение, которое содержит аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:10). В некоторых случаях соединение может иметь аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с последовательностью SEQ ID NO:10.

[0030] В качестве альтернативы предложено соединение, которое содержит аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSSPP (SEQ ID NO:11). В некоторых случаях соединение может иметь аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с последовательностью SEQ ID NO:11.

[0031] В качестве альтернативы предложено соединение, которое содержит аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGK GREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG

QGTLLTVSS (SEQ ID NO:12). В некоторых случаях соединение может иметь аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с последовательностью SEQ ID NO:12.

[0032] В качестве альтернативы предложено соединение, которое содержит аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG

QGTLLTVSSPP (SEQ ID NO:13). В некоторых случаях соединение может иметь аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с последовательностью SEQ ID NO:13.

[0033] В качестве альтернативы предложено соединение, которое содержит аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTVSSTAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGSVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAVRPGRPLITSRDANLYDYWG

QGTLLTVSS (SEQ ID NO:45). В некоторых случаях соединение может иметь аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с последовательностью SEQ ID NO:45.

[0034] В качестве альтернативы предложено соединение, которое содержит аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDSTAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSRVANLYPYWG

QGTLLTVSS (SEQ ID NO:46). В некоторых случаях соединение может иметь аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с последовательностью SEQ ID NO:46.

[0035] В качестве альтернативы предложено соединение, которое содержит аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASYRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG

QGTLLTVSS (SEQ ID NO:47). В некоторых случаях соединение может иметь аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с последовательностью SEQ ID NO:47.

[0036] В качестве альтернативы предложено соединение, которое содержит аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGAYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG

QGTLVTVSS (SEQ ID NO:48). В некоторых случаях соединение может иметь аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с последовательностью SEQ ID NO:48.

[0037] В качестве альтернативы предложено соединение, которое содержит аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDET
YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYW

GQGLTVTVSS (SEQ ID NO:49). В некоторых случаях соединение может иметь аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с последовательностью SEQ ID NO:49.

[0038] В качестве альтернативы предложено соединение, которое содержит аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDQT
YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYW

GQGLTVTVSS (SEQ ID NO:50). В некоторых случаях соединение может иметь аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с последовательностью SEQ ID NO:50.

[0039] В качестве альтернативы предложено соединение, которое содержит аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITA
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG

QGTLVTVSS (SEQ ID NO:51). В некоторых случаях соединение может иметь аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с последовательностью SEQ ID NO:51.

[0040] В качестве альтернативы предложено соединение, которое содержит аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITE
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG

QGTLVTVSS (SEQ ID NO:52). В некоторых случаях соединение может иметь аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с последовательностью SEQ ID NO:52.

[0041] В качестве альтернативы предложено соединение, которое содержит аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITQ
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG

QGTLVTVSS (SEQ ID NO:53). В некоторых случаях соединение может иметь аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с последовательностью SEQ ID NO:53.

[0042] В качестве альтернативы предложено соединение, которое содержит аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITS
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG

QGTLVTVSS (SEQ ID NO:54). В некоторых случаях соединение может иметь аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с последовательностью SEQ ID NO:54.

[0043] В качестве альтернативы предложено соединение, которое содержит аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITT
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG

QGTLVTVSS (SEQ ID NO:55). В некоторых случаях соединение может иметь аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с последовательностью SEQ ID NO:55.

[0044] В качестве альтернативы предложено соединение, которое содержит аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGKPLITSKVADLYPYWG

QGTLVTVSS (SEQ ID NO:56). В некоторых случаях соединение может иметь аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с последовательностью SEQ ID NO:56.

[0045] В качестве альтернативы предложено соединение, которое содержит аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGQPLITSKVADLYPYWG

QGTLVTVSS (SEQ ID NO:57). В некоторых случаях соединение может иметь аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с последовательностью SEQ ID NO:57.

[0046] В качестве альтернативы предложено соединение, которое содержит аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGSPLITSKVADLYPYWG

QGTLLTVSS (SEQ ID NO:58). В некоторых случаях соединение может иметь аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с последовательностью SEQ ID NO:58.

[0047] В качестве альтернативы предложено соединение, которое содержит аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRELITSKVADLYPYWG

QGTLLTVSS (SEQ ID NO:59). В некоторых случаях соединение может иметь аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с последовательностью SEQ ID NO:59.

[0048] В качестве альтернативы предложено соединение, которое содержит аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRLITSKVADLYPYWG

QGTLLTVSS (SEQ ID NO:60). В некоторых случаях соединение может иметь аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с последовательностью SEQ ID NO:60.

[0049] В качестве альтернативы предложено соединение, которое содержит аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRLITSKVADLYPYWG

QGTLLTVSS (SEQ ID NO:61). В некоторых случаях соединение может иметь аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с последовательностью SEQ ID NO:61.

[0050] В качестве альтернативы предложено соединение, которое содержит аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGREITSKVADLYPYWG

QGTLLTVSS (SEQ ID NO:62). В некоторых случаях соединение может иметь аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с последовательностью SEQ ID NO:62.

[0051] В качестве альтернативы предложено соединение, которое содержит аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRITSKVADLYPYWG

QGTLLTVSS (SEQ ID NO:63). В некоторых случаях соединение может иметь аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с последовательностью SEQ ID NO:63.

[0052] В качестве альтернативы предложено соединение, которое содержит аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPQITSKVADLYPYWG

QGTLLTVSS (SEQ ID NO:64). В некоторых случаях соединение может иметь аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с последовательностью SEQ ID NO:64.

[0053] В качестве альтернативы предложено соединение, которое содержит аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPTITSKVADLYPYWG

QGTLLTVSS (SEQ ID NO:65). В некоторых случаях соединение может иметь аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с последовательностью SEQ ID NO:65.

[0054] В качестве альтернативы предложено соединение, которое содержит аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITEKVADLYPYWG

QGTLLTVSS (SEQ ID NO:66). В некоторых случаях соединение может иметь аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, от около 90% до около 99% сходства последовательности с последовательностью SEQ ID NO:66.

[0055] Преимущество аналогов RLN, описанных в данном документе, состоит в том, что они могут быть химически или рекомбинантно синтезированы в виде одноцепочечного полипептида (*т. е.* мономерного) и, таким образом, не требуют эндопротеолитической обработки для обеспечения биологической активности. Однако предполагается, что в некоторых случаях фрагмент VHH может быть конъюгирован не только с одноцепочечными РНЛ, но также и с двухцепочечными RLN (*например*, нативными). На фрагменте VHH полипептид можно конъюгировать не только с N- и C-концом, но также с любой открытой аминокислотой VHH (при условии, что такая конъюгация не полностью отменяет связывание альбумина).

[0056] Преимущество аналогов RLN, описанных в данном документе, состоит в том, что фрагменты VHH можно использовать не только с нативными последовательностями А-

цепи и В-цепи, но также с их модифицированными последовательностями. Более того, фрагменты VHH могут быть дополнительно модифицированы для получения усиленных или дополнительных функциональных возможностей за счет слияния других пептидов/белков или небольших молекул, присоединяемых к фрагментам VHH.

[0057] Преимущество аналогов RLN, описанных в данном документе, состоит в том, что фрагменты VHH обеспечивают увеличенную продолжительность действия у млекопитающих, таких как человек, и могут иметь $t_{1/2}$ от около 20 дней до около 30 дней, что позволяет вводить их, по меньшей мере, раз в неделю или раз в две недели по сравнению с нативным RLN человека, в особенности с нативным RLN2 человека (SEQ ID NO: 5 и 6), что может улучшить соблюдение режима терапии.

[0058] Преимущество аналогов RLN, описанных в данном документе, состоит в том, что они имеют подобную или лучшую селективность, аффинность и/или эффективность в отношении рецепторов RXFP1, чем рецепторов RXFP2, по сравнению с нативным RLN2 человека (SEQ ID NO: 5 и 6). В качестве альтернативы аналоги RLN, описанные в данном документе, приводят к достаточной активности рецептора RXFP1 и снижению или недостаточной активности одного или более рецепторов RXFP2, RXFP3 и RXFP4.

[0059] Преимущество аналогов RLN, описанных в данном документе, состоит в том, что они обладают настраиваемой фармакокинетикой, достигаемой за счет изменения аффинности к альбумину фрагментов VHH.

[0060] Преимущество аналогов RLN, описанных в данном документе, состоит в том, что они обладают улучшенной стабильностью в консервированном приготовлении по сравнению с нативным RLN2 человека (SEQ ID NO: 5 и 6) или аналогами RLN, имеющими слияние Fc.

[0061] Более того, преимуществом фрагментов VHH является то, что они имеют равное связывание не только с сывороточный альбумин человека, но и с сывороточным альбумином собак, обезьян, мышей, свиней и крыс, что позволяет проводить фармакодинамические, фармакокинетические и токсикологические исследования для более легкого перехода с этих видов на людей.

[0062] Преимущество фрагментов VHH заключается в том, что их можно не только использовать для улучшения $t_{1/2}$ аналогов RLN, описанных в данном документе, по сравнению с нативным RLN2 человека (SEQ ID NO: 5 и 6), но также их можно использовать для улучшения $t_{1/2}$ других биологически активных пептидов и белков, таких как, например, инсулин, фактор роста и дифференцировки 15 (ФРД-15, GDF-15) или глюкозозависимый инсулиноотропный пептид 1 (ГИП-1, GLP-1).

[0063] Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют значения, совпадающие с общепринятыми среди специалистов в области техники, к которой относится данное раскрытие. Несмотря на то, что любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, могут быть использованы на практике или при исследовании аналогов RLN, фармацевтических композиций и способов, в данном документе описаны предпочтительные способы и материалы.

[0064] Кроме того, упоминание элемента в единственном числе не исключает возможности присутствия более чем одного из элементов, если контекст явным образом не предполагает присутствия одного и только одного из элементов. Соответственно, термины в единственном числе обычно означают «по меньшей мере, один».

[0065] *Определения*

[0066] Используемый в контексте данного документа термин «около» означает в пределах статистически значимого диапазона значения или значений, таких как, например, установленная концентрация, длина, молекулярная масса, pH, сходство последовательности, временные рамки, температура, объем и *т. д.* Такое значение или диапазон может быть в пределах порядка, обычно в пределах 20%, более типично в пределах 10% и даже более типично в пределах 5% от данного значения или диапазона. Допустимое отклонение, охватываемое термином «около», будет зависеть от конкретной исследуемой системы и может быть легко оценено специалистом в данной области техники.

[0067] В контексте данного документа и в отношении одного или большего количества рецепторов RXFP, термин «активность», «активировать», «активирующий» и тому подобное означает активность соединения, например, описанных в данном документе аналогов RLN, относительно связывания и индукции ответа у их рецептора (ов), что измеряется с помощью анализов, известных в данной области техники, таких как анализы *in vitro*, описанные ниже.

[0068] Используемый в контексте данного документа термин «аминокислота» означает молекулу, которая с химической точки зрения характеризуется наличием одной или более аминогрупп и одной или более групп карбоновых кислот и может содержать другие функциональные группы. Как известно в данной области техники, существует набор из двадцати аминокислот, которые обозначены как стандартные аминокислоты и могут использоваться в качестве строительных блоков для большинства пептидов/белков, продуцируемых любым живым существом. Аминокислотные последовательности по

данному раскрытию содержат стандартные однобуквенные или трехбуквенные коды для двадцати стандартных аминокислот.

[0069] Используемый в контексте данного документа термин «аналог» означает соединение, такое как синтетический пептид или полипептид, которое активирует рецептор-мишень и вызывает, по меньшей мере, один эффект *in vivo* или *in vitro*, вызываемый нативным агонистом этого рецептора.

[0070] Используемый в контексте данного документа термин «консервативная замена» означает вариант референтного пептида или полипептида, который идентичен референтной молекуле, за исключением наличия одной или более консервативных аминокислотных замен в его аминокислотной последовательности. В общем, вариант, полученный путем консервативной модификации, включает аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична референтной аминокислотной последовательности. Более конкретно, консервативная замена относится к замене аминокислоты аминокислотой, имеющей аналогичные характеристики (*например*, заряд, размер боковой цепи, гидрофобность/гидрофильность, конформацию и жесткость основной цепи и *т. д.*) и оказывающая минимальное влияние на биологическую активность полученного путем замены пептида или полипептида. Консервативные замены функционально подобных аминокислот хорошо известны в данной области техники, и поэтому нет необходимости тщательно описывать их в данном документе.

[0071] Используемый в контексте данного документа термин «эффективное количество» означает количество или дозу одного или более аналогов RLN, описанных в данном документе, или их фармацевтически приемлемой соли, которая при однократном или многократном введении дозы индивидууму, нуждающемуся в этом, обеспечивает желаемый эффект у такого индивидуума, находящегося на диагностике или лечении (*т. е.* может вызывать клинически измеримые различия в состоянии индивидуума, такие как, например, усиление ангиогенеза, повышение эластичности сосудов, увеличение сердечного кровотока, увеличение печеночного кровотока, увеличение легочного кровотока, увеличение почечного кровотока, повышение скорости клубочковой фильтрации, снижение артериального давления, уменьшение (или предотвращение) воспаления и/или уменьшение (или предотвращение) фиброза сердца, почек, печени или легких). Эффективное количество может быть легко определено специалистом в данной области техники с помощью известных способов и путем наблюдения результатов, полученных при аналогичных обстоятельствах. При определении эффективного количества для индивидуума рассматривается ряд факторов, включая, но не

ограничиваясь этим, вид млекопитающего, его размер, возраст и общее состояние здоровья, специфическое заболевание или нарушение, степень или вовлечение, или тяжесть заболевания или нарушения, ответ индивидуума, определенный введенный аналог RLN, способ введения, характеристики биодоступности вводимого приготовления, выбранную схему введения дозы, использование сопутствующих медикаментов и другие соответствующие обстоятельства.

[0072] Используемый в контексте данного документа термин «увеличенная продолжительность действия» означает, что аффинность связывания и активность для аналога RLN, описанного в данном документе, сохраняется в течение периода времени, превышающего период времени нативного RLN, в особенности нативного RLN2 человека (SEQ ID NO:5 и 6), что позволяет вводить дозу реже, например, один раз в день, три раза в неделю, два раза в неделю или один раз в неделю. Профиль временного действия аналога RLN можно измерить с помощью известных способов фармакокинетических анализов, таких как те, которые применяются в приведенных ниже Примерах.

[0073] Используемый в контексте данного документа термин «период полувыведения» или « $t_{1/2}$ » означает время, необходимое для того, чтобы половина количества соединения, такого как нативный RLN или аналог RLN, описанный в данном документе, была удалена из жидкости или другого физиологического пространства, такого как сыворотка или плазма индивидуума, с помощью биологических процессов. В качестве альтернативы $t_{1/2}$ также может означать время, за которое некоторое количество такого соединения теряет половину своей фармакологической, физиологической или радиологической активности.

[0074] Используемый в контексте данного документа термин «полумаксимальная эффективная концентрация» или «EC₅₀» означает концентрацию соединения, которая приводит к 50% активации/стимуляции конечной точки анализа, такой как кривая зависимости доза-ответ (*например*, пути передачи сигналов цАМФ, PI3K-Akt, NFκB, ФРЭС и/или оксида азота (NO)).

[0075] Используемый в контексте данного документа термин «в комбинации с» означает введение, по меньшей мере, одного из аналогов RLN, описанных в данном документе, одновременно, последовательно или в виде единого комбинированного приготовления с одним или более дополнительными терапевтическими агентами.

[0076] В контексте данного документа термин «индивидуум, нуждающийся в этом» означает млекопитающее, *например*, человека, имеющего патологическое состояние, заболевание, нарушение или симптом, требующий лечения или терапии, включая, *например*, перечисленные в данном документе. В частности, индивидуум для лечения представляет собой человека.

[0077] Используемый в контексте данного документа термин «продолжительного действия» означает, что аффинность связывания и активность аналога RLN, описанного в данном документе, сохраняется в течение периода времени, превышающего период времени, характерного для нативного RLN2 человека (SEQ ID NO:5 и 6), что позволяет вводить дозу реже, например, один раз в день или даже три раза в неделю, два раза в неделю или один раз в неделю или ежемесячно. Профиль временного действия аналогов RLN можно измерить с помощью известных способов фармакокинетических анализов, таких как те, которые описываются в приведенных ниже Примерах.

[0078] Используемый в контексте данного документа термин «нестандартная аминокислота» означает аминокислоту, которая может естественным образом встречаться в клетках, но не участвует в синтезе пептидов. Нестандартные аминокислоты могут быть составляющими пептида и часто образуются путем модификации стандартных аминокислот в пептиде (*т. е.* посредством посттрансляционной модификации). Нестандартные аминокислоты могут включать D-аминокислоты, которые имеют абсолютную хиральность, противоположную указанной выше стандартным аминокислотам.

[0079] Используемый в контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый буфер» означает любой из стандартных фармацевтических буферов, известных специалисту в данной области техники.

[0080] Используемый в контексте данного документа термин «RLN (RLN)» означает релаксин, полученный от или на основе любого вида, такого как виды млекопитающих, в особенности человека, при этом нативная форма представляет собой гетеродимерный пептид, имеющий две пептидные цепи (*например*, А-цепь и В-цепь), соединенные двумя дисульфидными связями, при этом А-цепь дополнительно имеет одну внутримолекулярную дисульфидную связь. RLN включает как нативный RLN (*т. е.* полноразмерный), так и его варианты (*т. е.* добавления, делеции, вставки и/или замены нативного RLN). У человека существует три нативные изоформы RLN - RLN1, RLN2 и RLN3. Процессинг RLN начинается с препро-релаксина, который процессируется до про-релаксина (содержит А-цепь, В-цепь и С-пептид; нативный RLN имеет структуру В-С-А), при этом последовательность нативного проRLN1 человека представлена в SEQ ID NO:1 (*см. также*, номер доступа в базе данных UniProt/SwissProt № P04808), последовательность нативного проRLN2 человека представлена в SEQ ID NO:4 (*см. также*, номер доступа в базе данных UniProt/SwissProt № P04090), и последовательность нативного проRLN3 человека приведена в SEQ ID NO:7 (*см. также*, номер доступа в базе данных UniProt/SwissProt № Q8WXF3). Пропро-релаксин подвергается дальнейшему

процессингу, в ходе которого С-пептид отщепляется, чтобы достичь RLN. Последовательности А-цепи нативных RLN1, RLN2 и RLN3 человека представлены в SEQ ID NO:2, 5 и 8, соответственно. Аналогичным образом, последовательности В-цепи нативных RLN1, RLN2 и RLN3 человека представлены в SEQ ID NO:3, 6 и 9, соответственно.

[0081] У человека имеется четыре рецептора RLN – RXFP1 (SEQ ID NO:40; *см. также*, номер доступа в базе данных UniProt/SwissProt № Q9HBX9), RXFP2 (SEQ ID NO:41; *см. также*, номер доступа в базе данных UniProt/SwissProt № Q8WXD0), RXFP3 (SEQ ID NO:42; *см. также*, номер доступа в базе данных UniProt/SwissProt № Q9NSD7) и RXFP4 (SEQ ID NO:43; *см. также*, номер доступа в базе данных UniProt/SwissProt № Q8TDU9) - которые действуют как GPCR (*см.*, Halls *et al.* (2007) *Br. J. Pharmacol.* 150:677-691). В данном документе интерес представляют рецепторы RXFP1 и RXFP2, оба из которых могут связывать RLN1 и RLN2. Рецептор RXFP1 был обнаружен в мозге, клетках крови, костях, сердце, почках, легких, печени и сосудистой системе, тогда как рецептор RXFP2 встречается гораздо более ограниченно и был обнаружен в кости и направляющей связке яйца. Стимуляция рецепторов RXFP1 и RXFP2 активирует сети передачи сигналов, включающие аденилатциклазу, протеинкиназу А, протеинкиназу С, фосфатидилинозитол-3-киназу и/или киназы, регулируемые внеклеточными сигналами (Erk1/2).

[0082] Используемый в контексте данного документа термин «аналог RLN» и т.п. означает соединение, такое как пептид или полипептид, которое оказывает одно или более влияний нативного RLN на один или более рецепторов RXFP, но варьируется некоторым образом в отношении аминокислотной последовательности по сравнению с нативным RLN. Аналог RLN также может включать варианты этих соединений, которые функционально эквивалентны RLN, но имеют последовательности, которые являются фрагментами последовательности или представляют собой полную последовательность, но с наличием добавлений, делеций, вставок и/или замен. Все ссылки на положения аминокислот в не модифицированных или модифицированных RLN, описанных в данном документе, основаны на соответствующем положении в А-цепи с последовательностью SEQ ID NO:5 или В-цепи с последовательностью SEQ ID NO:6 нативного RLN2 человека, если не указано иное. В некоторых случаях аналоги RLN, описанные в данном документе, могут связываться с RXFP с более высокой или более низкой аффинностью, но демонстрируют более длительный $t_{1/2}$ *in vivo* или *in vitro* по сравнению с нативным RLN, в особенности с нативным RLN2 человека (SEQ ID NO:5 и 6). Таким образом, аналоги RLN, описанные в данном документе, представляют собой синтетические соединения, которые действуют как агонисты рецептора RXFP.

[0083] Используемый в контексте данного документа термин «сходство последовательностей» означает количественное свойство двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислотных последовательностей биологических соединений, такое как, например, соответствие по всей длине или окна сравнения двух или более последовательностей. Сходство последовательностей можно измерить по (1) проценту идентичности или (2) проценту сходства. Процент идентичности измеряет процент остатков, идентичных между двумя биологическими соединениями, деленный на длину самой короткой последовательности; тогда как процент сходства измеряет идентичность и, кроме того, включает в оценку пробелы в последовательностях и сходство остатков. Способы и алгоритмы определения сходства последовательностей хорошо известны в данной области техники, и поэтому нет необходимости в их исчерпывающем описании в данном документе. Установленный процент идентичных положений нуклеотидов или аминокислот составляет, по меньшей мере, около 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или выше.

[0084] Используемые в контексте данного документа термины «одноцепочечный релаксин», «оцRLN» и т.п. означают полипептид RLN, в котором цепи A и B соединены друг с другом линкером (*m. e.* L₂), как в A-L₂-B или B-L₂-A. Более того, оцRLN может содержать, по меньшей мере, одну из нативных межцепочечных и/или внутрицепочечных дисульфидных связей для поддержания правильной структурной укладки.

[0085] Используемые в контексте данного документа термины «двухцепочечный релаксин», «дцRLN» и т.п. означают полипептид RLN, в котором цепи A и B связаны друг с другом одной или более межцепочечными и/или внутрицепочечными дисульфидными связями, но не связаны какими-либо линкерами, для поддержания правильной структурной укладки, такой как у нативного RLN.

[0086] Используемый в контексте данного документа термин «лечение» или «лечить» означает лечение и уход за человеком, имеющим патологическое состояние, заболевание, нарушение или симптом, при которых показано введение аналога RLN с целью ослабления, сдерживания, регрессии, замедления или остановки прогрессирования или уменьшения тяжести патологического состояния, заболевания, нарушения и/или симптома. Лечение включает введение аналога RLN, описанного в данном документе, или композиции, содержащей аналог RLN, описанный в данном документе, индивидууму для предотвращения появления симптомов или осложнений, облегчения симптомов или осложнений или устранения патологического состояния, заболевания, нарушения или симптома. Лечение включает введение индивидууму аналога RLN или композиции,

содержащей аналог RLN, описанный в данном документе, что приводит, например, к усилению ангиогенеза, повышению эластичности сосудов, увеличению сердечного кровотока, увеличению печеночного кровотока, увеличению легочного кровотока, увеличению почечного кровотока, повышению скорости клубочковой фильтрации, снижению артериального давления, уменьшению (или предотвращению) воспаления и/или уменьшению (или предотвращению) фиброза сердца, почек, печени или легких). Индивидуум, который проходит лечение, представляет собой млекопитающее, в частности человека.

[0087] Используемые в контексте данного документа термины «индивид», «пациент» и «субъект» используются взаимозаменяемо и обозначают млекопитающее, в частности человека. В некоторых случаях индивидуум дополнительно характеризуется наличием у него патологического состояния, заболевания, нарушения и/или симптома, которые могут улучшиться при введении аналога RLN, описанного в данном документе.

[0088] Используемый в контексте данного документа термин «VНН» или «фрагмент VНН» означает форму однодоменного антитела, в особенности фрагмент антитела единственной мономерной вариабельной области антитела, состоящего только из тяжелой цепи (HcAb), который имеет очень маленький размер около 15 кДа. В данном документе пришли к заключению, что фрагменты VНН можно использовать в качестве фармакокинетического усилителя для увеличения продолжительности действия и/или улучшения $t_{1/2}$ аналогов RLN, описанных в данном документе. Фрагменты VНН, описанные в данном документе, связывают сывороточный альбумин; однако фрагменты VНН можно использовать для связывания IgG (включая домен Fc), неонатального Fc-рецептора (FcRn) или других белков сыворотки пролонгированного действия. Хотя фрагменты VНН, описанные в данном документе, используются для увеличения $t_{1/2}$ RLN, они также могут использоваться для улучшения $t_{1/2}$ других биологически активных пептидов/белков, таких как, например, инсулин, ФРД-15 или ГИП-1.

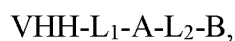
[0089] Некоторые сокращения определены следующим образом: «ACR» относится к соотношению альбумин в моче/креатинин в моче; «а. ед. м.» относится к атомной единице массы; «AUC» относится к площади под кривой; «Вос» относится к трет-бутоксикарбонилу; «цАМФ» относится к циклическому аденозинмонофосфату; «ЦМВ» относится к цитомегаловирусу; «CV» относится к объему колонки; «ДНК» относится к дезоксирибонуклеиновой кислоте; «ДМФ» относится к диметилформамиду; «ДМСО» относится к диметилсульфоксиду; «EDC» относится к гидрохлориду 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида; «ЭДТА» относится к этилендиаминтетрауксусной кислоте; «ИФА/ РИА» относится к иммуноферментному анализу/радиоиммуноанализу;

«ЕТА» относится к этаноламину; «ГС» относится к глутамин синтетазе; «ХГВ» относится к хроматографии с гидрофобным взаимодействием; «ч» относится к часу или часам; «ГФВР» относится к гомогенной флуоресценции с временным разрешением; «в/в» относится к внутривенному введению; «в/б» относится к внутривенному введению; «кДа» относится к килодальтонам; «ЖХ/МС» относится к жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией; «мин» относится к минуте или минутам; «МС» относится к масс-спектрометрии; «МСО» относится к метионин сульфоксимины; «NaOAc» относится к ацетату натрия; «NHS» относится к N-гидроксисукцинимиду; «OtBu» относится к О-трет-бутилу; «Pbf» относится к NG-2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонилю; «ПЭА» относится к полиэтилену; «ОФ-ВЭЖХ» относится к обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии; «RU» относится к резонансным единицам; «сек» относится к секунде или секундам; «ППР» относится к поверхностному плазмонному резонансу; «п/к» относится к подкожному введению; «SEC» относится к эксклюзионной хроматографии по размеру; «SEM» относится к стандартной ошибке среднего; «ТФУ» относится к трифторуксусной кислоте; и «Трт» относится к тритилу.

[0090] *Аналоги RLN*

[0091] Описанные в данном документе аналоги RLN имеют структурное сходство с нативным RLN человека, но имеют и много структурных отличий. Например, по сравнению с нативным RLN2 человека (SEQ ID NO:5 и 6) у аналогов RLN отсутствует одна или более аминокислот, присутствующих в нативном RLN2 человека, при этом аналоги включают пептидный линкер между А-цепью и В-цепью, и включают альбумин-связывающий фрагмент VHH. Аналоги RLN приводят к достаточной активности рецептора RXFP1 и снижению или недостаточной активности одного или более рецепторов RXFP2, RXFP3 и RXFP4. Аналогичным образом, аналоги RLN обладают полезными свойствами, относящимися к возможности их применения в качестве терапевтических способов лечения, включая улучшенную растворимость в водных растворах, улучшенную химическую и физическую стабильность приготовления, расширенный фармакокинетический профиль (который может быть отрегулирован на основе аффинности VHH к сывороточному альбумину) и/или минимальный потенциал для иммуногенности.

[0092] Вкратце, аналоги RLN, описанные в данном документе, содержат аминокислотную последовательность от N-конца до С-конца, имеющую одну из следующих структур:



VHH-L₁-B-L₂-A,

A-L₂-B-L₁-VHH или

B-L₂-A-L₁-VHH,

где VHH представляет собой фрагмент, действующий как фармакокинетический усилитель, A представляет собой A-цепь RLN, B представляет собой B-цепь RLN, L₁ представляет собой первый пептидный линкер и L₂ представляет собой второй пептидный линкер, при этом L₁ и L₂ отличаются от друг друга (*т. е.* у каждого из них не одинаковая аминокислотная последовательность).

[0093] Что касается A-цепи, то она может представлять собой A-цепь нативного RLN1, такую как A-цепь нативного RLN1 человека (SEQ ID NO:2); A-цепь нативного RLN2 человека (SEQ ID NO:5); или A-цепь нативного RLN3 человека (SEQ ID NO:8). Альтернативно, A-цепь может представлять собой ее вариант. Например, один вариант A-цепи может иметь аминокислотную последовательность, в которой отсутствуют остатки с 1 по 4 в последовательности SEQ ID NO:5 (*т. е.* A-цепь des1-4 RLN2 человека или desA1-4).

[0094] Аналогичным образом, что касается B-цепи, то она может представлять собой B-цепь нативного RLN, такую как B-цепь нативного RLN1 человека (SEQ ID NO:3); B-цепь нативного RLN2 человека (SEQ ID NO:6); или B-цепь нативного RLN3 человека (SEQ ID NO:9). Альтернативно, B-цепь может представлять собой ее вариант. Например, один вариант B-цепи может иметь аминокислотную последовательность, в которой отсутствует остаток 1 в последовательности SEQ ID NO:6 (*т. е.* B-цепь des1 RLN2 человека или desB1).

[0095] В некоторых случаях A-цепь может представлять собой A-цепь нативного RLN1 человека (SEQ ID NO:2), а B-цепь может представлять собой B-цепь нативного RLN1 человека (SEQ ID NO:3); A-цепь может представлять собой A-цепь нативного RLN2 человека (SEQ ID NO:5), а B-цепь может представлять собой B-цепь нативного RLN2 человека (SEQ ID NO:6); A-цепь может представлять собой A-цепь нативного RLN3 человека (SEQ ID NO:8), а B-цепь может представлять собой B-цепь нативного RLN3 человека (SEQ ID NO:9); A-цепь может представлять собой A-цепь нативного RLN1 человека (SEQ ID NO:2), а B-цепь может представлять собой B-цепь нативного RLN2 человека (SEQ ID NO:6); A-цепь может представлять собой A-цепь нативного RLN1 человека (SEQ ID NO:2), а B-цепь может представлять собой B-цепь нативного RLN3 человека (SEQ ID NO:9); A-цепь может представлять собой A-цепь нативного RLN2 человека (SEQ ID NO:5), а B-цепь может представлять собой B-цепь нативного RLN1 человека (SEQ ID NO:3); A-цепь может представлять собой A-цепь нативного RLN2

человека (SEQ ID NO:5), а В-цепь может представлять собой В-цепь нативного RLN3 человека (SEQ ID NO:9); А-цепь может представлять собой А-цепь нативного RLN3 человека (SEQ ID NO:8), а В-цепь может представлять собой В-цепь нативного RLN1 человека (SEQ ID NO:3); или А-цепь может представлять собой А-цепь нативного RLN3 человека (SEQ ID NO:8), а В-цепь может представлять собой В-цепь нативного RLN2 человека (SEQ ID NO:6).

[0096] В некоторых случаях А-цепь может представлять собой вариант А-цепи RLN2, в котором отсутствуют остатки с 1 по 4 (desA1-4), а В-цепь может представлять собой любую нативную В-цепь. В других случаях А-цепь может представлять собой любую нативную А-цепь, а В-цепь может представлять собой вариант В-цепи RLN2, в котором отсутствует остаток 1 (desB1). В других случаях А-цепь может представлять собой вариант А-цепи RLN2, в котором отсутствуют остатки с 1 по 4 (desA1-4), а В-цепь может представлять собой вариант В-цепи RLN2, в котором отсутствует остаток 1 (desB1). В некоторых случаях А-цепь представляет собой вариант desA1-4. В некоторых случаях В-цепь представляет собой вариант desB1.

[0097] Другие цепи А и В, которые можно использовать в аналогах RLN, описанных в данном документе, описаны, например, в публикации международной заявки на патент WO 2018/148419, WO 2018/138170, WO 2017/201340, WO 2016/149501, WO 2015/157829, WO 2015/067791, WO 2015/067113, WO 2014/102179, WO 2013/177529, WO 2013/007563, WO 2013/004607, WO 2012/031326 и WO 2012/024452; и публикации патентной заявки США № US 2011/0243942. См. также, Chan *et al.* (2012) *J. Biol. Chem.* 287:41152-41164; Claasz *et al.* (2002) *Eur. J. Biochem.* 269:6287-6293; Hossain *et al.* (2015) *Org. Biomol. Chem.* 13:10895-10890; Hossain *et al.* (2016) *Chem. Sci.* 7:3805-3819; Park *et al.* (2008) *J. Biol. Chem.* 283:32099-32109 и Wilkinson *et al.* (2005) *BMC Evol. Biol.* 5:14.

[0098] Что касается L₁, то он может представлять собой пептид, содержащий от около 1 аминокислоты до около 50 аминокислот. Альтернативно, L₁ может состоять из около 1, около 5, около 10, около 15, около 20, около 25, около 30, около 35, около 40, около 45 или около 50 аминокислот. Альтернативно, L₁ может состоять из от около 5 аминокислот до около 10 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 15 аминокислот, от около 15 аминокислот до около 20 аминокислот, от около 20 аминокислот до около 25 аминокислот, от около 25 аминокислот до около 30 аминокислот, от около 30 аминокислот до около 35 аминокислот, от около 35 аминокислот до около 40 аминокислот, от около 40 аминокислот до около 45 аминокислот или от около 45 аминокислот до около 50 аминокислот. В некоторых случаях L₁ может быть пропущен, так что А-цепь или В-цепь напрямую конъюгированы с фрагментом VHH. В некоторых

случаях L_1 может содержать повторяющуюся последовательность $(GGGGQ)_n$ (SEQ ID NO:14), где n может составлять от около 1 до около 10, в особенности 5 (*т. е.* $(GGGGQ)_5$; SEQ ID NO:19). В других случаях L_1 может содержать повторяющуюся последовательность $(PGPQ)_n$ (SEQ ID NO:17), где n может составлять от около 1 до около 10, в особенности 8 (*т. е.* $(PGPQ)_8$; SEQ ID NO:20). В других случаях L_1 может содержать повторяющуюся последовательность $(PGPA)_n$ (SEQ ID NO:18), где n может составлять от около 1 до около 10, в особенности 8 (*т. е.* $(PGPA)_8$; SEQ ID NO:21).

[0099] Другие линкеры, которые можно использовать в аналогах RLN в качестве L_1 , включают, но не ограничиваются ими, $(GGGQ)_n$ (SEQ ID NO:15) или $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO:16).

[0100] Что касается L_2 , то он может представлять собой пептид, содержащий от около 1 аминокислоты до около 15 аминокислот. Альтернативно, L_2 может состоять из около 1, около 2, около 3, около 4, около 5, около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 11, около 12, около 13, около 14 или около 15 аминокислот. Альтернативно, L_2 может состоять из от около 1 аминокислоты до около 5 аминокислот, от около 5 аминокислот до около 10 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 15 аминокислот, в особенности от около 10 аминокислот до около 15 аминокислот. В некоторых случаях L_2 может содержать смесь остатков Ala/A, Gln/Q, Gly/G, Pro/P и Ser/S. В других случаях L_2 может представлять собой последовательность SEQ ID NO:22, 23 или 67.

[0101] Что касается VHN, то он может представлять собой полипептид, содержащий от около 50 до около 200 аминокислот, в особенности от около 125 до около 150 аминокислот, который может связывать сывороточный альбумин или другой сывороточный белок, имеющий длинный $t_{1/2}$. В некоторых случаях VHN может представлять собой любую из последовательностей SEQ ID NO:10-13. Альтернативно, VHN может представлять собой любую из последовательностей SEQ ID NO:45-66. Структурные особенности этих фрагментов VHN приводят к тому, что аналоги RLN имеют более длинный $t_{1/2}$ по сравнению с нативным RLN, в особенности по сравнению с нативным RLN2 человека (SEQ ID NO:5 и 6). Учитывая, что фрагменты VHN, описанные в данном документе, нацелены на сывороточный альбумин, можно ожидать, что $t_{1/2}$ аналога RLN будет аналогичным таковому у сывороточного альбумина видов, которым вводят аналог RLN (с учетом любого опосредованного мишенью распределения лекарственного средства).

[0102] В дополнение к изменениям, описанным в раскрытии, аналоги RLN, описанные в данном документе, могут включать одну или более дополнительных аминокислотных

модификаций, в особенности консервативные замены, при условии, однако, что аналоги RLN остаются способными связываться с рецептором RXFP1 и активировать его.

[0103] В целом, иллюстративные аналоги RLN представляют собой:

RLN-Аналог 1, который содержит фрагмент VHH (подчеркнут), L₁ (G4Q)₅ (выделен курсивом), А-цепь RLN2, L₂ из десяти остатков (выделено жирным шрифтом) и В-цепь (desB1) RLN2, и имеет следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLES**GGGLVQPGG**SLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN**SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG**
QGT**LVTVSS**GGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQQLYSALANKCCHVGCTKRSLAR
FC**GGGSGGSGGG**SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS (SEQ ID NO:24), или его
фармацевтически приемлемую соль;

RLN-Аналог 2, который содержит фрагмент VHH (подчеркнут), L₁ (PGPA)₈ (выделен курсивом), А-цепь RLN2, L₂ из десяти остатков (выделен жирным шрифтом) и В-цепь (desB1) RLN2, и имеет следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLES**GGGLVQPGG**SLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN**SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG**
QGT**LVTVSS**PGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAQLYSALANKCCHVGCTKR
SLARFC**GGGSGGSGGG**SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS (SEQ ID NO:25), или
его фармацевтически приемлемую соль;

RLN-Аналог 3, который содержит фрагмент VHH (подчеркнут), L₁ (G4Q)₅ (выделен курсивом), В-цепь (desB1) RLN2, L₂ из десяти остатков (выделен жирным шрифтом) и А-цепь RLN2, и имеет следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLES**GGGLVQPGG**SLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN**SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG**
QGT**LVTVSS**GGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICG
MSTWS**GGGSGGSGGG**QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC (SEQ ID NO:26), или его
фармацевтически приемлемую соль;

RLN-Аналог 4, который содержит фрагмент VHH (подчеркнут), L₁ (PGPQ)₈ (выделен курсивом), В-цепь (desB1) RLN2, L₂ из десяти остатков (выделен жирным шрифтом) и А-цепь RLN2, и имеет следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLES**GGGLVQPGG**SLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN**SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG**
QGT**LVTVSS**PGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQSWMEEVIKLCGRELVRA
QIAICGMSTWS**GGGSGGSGGG**QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC (SEQ ID NO:27),
или его фармацевтически приемлемую соль;

RLN-Аналог 5, который содержит В-цепь (desB1) RLN2, L₂ из десяти остатков (выделен жирным шрифтом), А-цепь RLN2, L₁ (G4Q)₅ (выделен курсивом) и фрагмент VHH (подчеркнут), и имеет следующую аминокислотную последовательность:

SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS**SGGSGGSGG**QLYSALANKCCHVGCTKRS
 LARFCGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ**EVQLLES**GGGLVQPGGSLRLSCAASG
RYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN**SKNTLYLQ**MNS
LRPETAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGT**LVTVSSPP** (SEQ ID NO:28), или его
 фармацевтически приемлемую соль;

RLN-Аналог 6, который содержит В-цепь (desB1) RLN2, L₂ из десяти остатков (выделен жирным шрифтом), А-цепь RLN2, L₁ (PGPQ)₈ (выделен курсивом) и фрагмент VHH (подчеркнут), и имеет следующую аминокислотную последовательность:

SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS**SGGSGGSGG**QLYSALANKCCHVGCTKRS
 LARFC**PGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQ****EVQLLES**GGGLVQPGGSLRLSC
AASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN**SKNTLYL**
QMNSLRPETAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGT**LVTVSSPP** (SEQ ID NO:29),
 или его фармацевтически приемлемую соль;

RLN-Аналог 7, который содержит фрагмент VHH (подчеркнут), L₁ (G4Q)₅ (выделен курсивом), В-цепь (desB1) RLN2, L₂ из десяти остатков (выделен жирным шрифтом) и А-цепь RLN2, и имеет следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETA**VAWFRQAPGK**REFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN**SKNTLYLQ**MNSLRPETA**VYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG**
QGT**LVTVSS**GGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ**SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICG**
MSTWSGGSGGSGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC (SEQ ID NO:30), или его
 фармацевтически приемлемую соль;

RLN-Аналог 8, который содержит фрагмент VHH (подчеркнут), L₁ (PGPQ)₈ (выделен курсивом), В-цепь (desB1) RLN2, L₂ из десяти остатков (выделен жирным шрифтом) и А-цепь RLN2, и имеет следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETA**VAWFRQAPGK**REFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN**SKNTLYLQ**MNSLRPETA**VYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG**
QGT**LVTVSS****PGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQ****SWMEEVIKLCGRELVRA**
QIAICGMSTWSGGSGGSGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC (SEQ ID NO:31),
 или его фармацевтически приемлемую соль;

RLN-Аналог 9, который содержит В-цепь (desB1) RLN2, L₂ из десяти остатков (выделен жирным шрифтом), А-цепь RLN2, L₁ (G4Q)₅ (выделен курсивом) и фрагмент VHH (подчеркнут), и имеет следующую аминокислотную последовательность:

SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS**SGGSGGSGGG**QLYSALANKCCHVGCTKRS
 LARFC**GGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ**EVQLLES**GGGLVQPGGSLRLSCAASG**
RYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGTLVTVSSPP (SEQ ID NO:32), или его
 фармацевтически приемлемую соль;

RLN-Аналог 10, который содержит В-цепь (desB1) RLN2, L₂ из десяти остатков (выделен жирным шрифтом), А-цепь RLN2, L₁ (PGPQ)₈ (выделен курсивом) и фрагмент VHH (подчеркнут), и имеет следующую аминокислотную последовательность:

SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS**SGGSGGSGGG**QLYSALANKCCHVGCTKRS
 LARFC**PGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQ**EVQLLES**GGGLVQPGGSLRLSC**
AASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL
QMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGTLVTVSSPP (SEQ ID NO:33),
 или его фармацевтически приемлемую соль;

RLN-Аналог 11, который содержит фрагмент VHH (подчеркнут), L₁ (G4Q)₅ (выделен курсивом), В-цепь (desB1) RLN2, L₂ из тринадцати остатков (выделен жирным шрифтом) и А-цепь (desA1-4) RLN2, и имеет следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQSWMEEVIKLCGRELVRAQIAI
 CGMSTWS**SGGSGGSGGSGGG**ALANKCCHVGCTKRSLARFC (SEQ ID NO:34), или его
 фармацевтически приемлемую соль;

RLN Аналог-12, который содержит фрагмент VHH (подчеркнут), L₁ (G4Q)₅ (выделен курсивом), В-цепь (desB1) RLN2, L₂ из тринадцати остатков (выделен жирным шрифтом) и А-цепь (desA1-4) RLN2, и имеет следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICG
 MSTWS**SGGSGGSGGSGGG**ALANKCCHVGCTKRSLARFC (SEQ ID NO:35), или его
 фармацевтически приемлемую соль;

RLN Аналог-13, который содержит фрагмент VHH (подчеркнут), L₁ (G4Q)₅ (выделен курсивом), А-цепь (desA1-4) RLN2, L₂ из десяти остатков (выделено жирным шрифтом) и В-цепь (desB1) RLN2, и имеет следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGRFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTTLTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQALANKCCHVGCTKRSLARFCGG
GSGGSGGGSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS (SEQ ID NO:36), или его
 фармацевтически приемлемую соль;

RLN-Аналог 14, который содержит фрагмент VHH (подчеркнут), L₁ (PGPQ)₈(выделен курсивом), А-цепь (desA1-4) RLN2, L₂ из десяти остатков (выделено жирным шрифтом) и В-цепь (desB1) RLN2, и имеет следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGRFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTTLTVSSPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQALANKCCHVGCTKRSLA
RFCGGGSGGSGGGSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS (SEQ ID NO:37), или его
 фармацевтически приемлемую соль;

RLN-Аналог 15, который содержит фрагмент VHH (подчеркнут), L₁ (G4Q)₅ (выделен курсивом), В-цепь (нативную) RLN2, L₂ из десяти остатков (выделен жирным шрифтом) и А-цепь (нативную) RLN2, и имеет следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTTLTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQDSWMEEVIKLCGRELVRAQIAIC
GMSTWSSGGGGSGGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC (SEQ ID NO:38), или его
 фармацевтически приемлемую соль; и

RLN-Аналог 16, который содержит фрагмент VHH (подчеркнут), L₁ (PGPA)₈(выделен курсивом), В-цепь (нативную) RLN2, L₂ из десяти остатков (выделен жирным шрифтом) и А-цепь (нативную) RLN2, и имеет следующую аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTTLTVSSPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPADSWMEEVIKLCGRELVRA
QIAICGMSTWSSGGGGSGGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC (SEQ ID NO:39),
 или его фармацевтически приемлемую соль.

[0104] Период полувыведения аналогов RLN, описанных в данном документе, может быть измерен с использованием способов, известных в данной области техники, включая, например, способы, описанные в приведенных ниже Примерах. Аналогичным образом,

аффинность аналогов RLN к альбуминам различных видов может быть измерена с использованием способов, известных в данной области техники для измерения аффинности связывания, например, тех, которые описаны в приведенных ниже Примерах, и обычно аффинность выражается в виде значения равновесной константы диссоциации (K_D). Более того, активность аналогов RLN для каждого из рецепторов RXFP может быть измерена с использованием способов, известных в данной области техники, включая, например, анализы активности *in vitro*, описанные ниже, и обычно выражается в виде значения EC_{50} .

[0105] В результате описанных выше модификаций аналоги RLN, описанные в данном документе, имеют $t_{1/2}$, который длиннее, чем у нативного RLN, в особенности у нативного RLN2 человека (SEQ ID NO:5 и 6) при введении млекопитающему, в особенности человеку. Как отмечалось выше, описанные в данном документе фрагменты VNH нацелены на сывороточный альбом; следовательно, можно ожидать, что $t_{1/2}$ аналогов RLN, описанных в данном документе, будет аналогичным таковому у сывороточного альбумина видов, которым вводят аналог RLN. В некоторых случаях аналоги RLN могут иметь $t_{1/2}$ от около 1 дня до около 31 дня, от около 5 дней до около 25 дней, от около 10 дней до около 20 дней или от около 15 дней. В других случаях аналоги RLN могут иметь $t_{1/2}$ от около 1 дня до около 5 дней, от около 6 дней до около 10 дней, от около 11 дней до около 15 дней, от около 16 дней до около 20 дней, от около 21 дня до около 25 дней или даже от около 26 до около 31 дня. В других случаях аналоги RLN могут иметь $t_{1/2}$ около 1 дня, около 2 дней, около 3 дней, около 4 дней, около 5 дней, около 6 дней, около 7 дней, около 8 дней, около 9 дней, около 10 дней, около 11 дней, около 12 дней, около 13 дней, около 14 дней, около 15 дней, около 16 дней, около 17 дней, около 18 дней, около 19 дней, около 20 дней, около 21 дня, около 22 дней, около 23 дней, около 24 дней, около 25 дней, около 26 дней, около 27 дней, около 28 дней, около 29 дней, около 30 дней или даже около 31 дня. В конкретных случаях аналоги RLN могут иметь $t_{1/2}$ около 20 дней при введении человеку.

[0106] Аналогичным образом, аналоги RLN, описанные в данном документе, обладают активностью в отношении рецептора RXFP1 от около 10 до около 100 раз выше по сравнению, например, с нативным RLN2 человека (SEQ ID NO:5 и 6) при введении человеку.

[0107] *Фармацевтические Композиции и Наборы*

[0108] Описанные в данном документе аналоги RLN могут быть приготовлены в виде фармацевтических композиций, которые можно вводить парентеральным путем (например, внутривенным, внутривентральным, внутримышечным, подкожным или

трансдермальным). Такие фармацевтические композиции и способы их приготовления хорошо известны в данной области техники. См., например, Remington, "The Science and Practice of Pharmacy" (D.B. Troy ed., 21st Ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 2006). В конкретных случаях аналоги RLN вводят п/к или в/в. Альтернативно, однако, аналоги RLN могут быть приготовлены в формах для других фармацевтически приемлемых путей, таких как, например, таблетки или другие твердые лекарственные формы для перорального введения; капсулы с замедленным высвобождением; и любые другие формы, используемые в данное время, включая кремы, лосьоны, лекарственные формы для ингаляции и т.п.

[0109] Как отмечалось ранее и, чтобы улучшить их переносимость и эффективность *in vivo*, аналоги RLN, описанные в данном документе, могут реагировать с любым веществом из ряда неорганических и органических кислот/оснований с образованием фармацевтически приемлемых солей присоединения кислоты/основания. Фармацевтически приемлемые соли и обычные способы их получения хорошо известны в данной области техники (см., например, Stahl *et al.*, "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use" (2nd Revised Ed. Wiley-VCH, 2011)). Фармацевтически приемлемые соли для использования, описанного в данном документе, включают соли натрия, трифторацетат, гидрохлорид и ацетат.

[0110] Описанные в данном документе аналоги RLN могут вводиться врачом или вводиться самостоятельно с помощью инъекции. Понятно, что номер калибра иглы и величина объема инъекции могут быть легко определены специалистом в данной области техники. Однако объем инъекции может составлять $\leq$ около 2 мл или даже $\leq$ около 1 мл, а калибр иглы может составлять $\geq$ около 27 G или даже $\geq$ около 29 G.

[0111] В раскрытии также предложены и, следовательно, охвачены новые промежуточные соединения и способы, полезные для синтеза аналогов RLN, описанных в данном документе, или их фармацевтически приемлемых солей. Промежуточные соединения и аналоги RLN могут быть получены различными способами, которые хорошо известны в данной области техники. Например, способ с использованием рекомбинантного синтеза проиллюстрирован в приведенных ниже примерах. Конкретные этапы для каждого из описанных способов можно комбинировать по-разному для получения аналогов RLN. Реагенты и исходные материалы легко доступны специалисту в данной области техники.

[0112] Аналоги RLN, описанные в данном документе, как правило, являются эффективными в широком диапазоне доз. Иллюстративные дозы аналогов RLN, описанных в данном документе, или фармацевтических композиций, включающих их,

могут быть в миллиграммах (мг) или микрограммах (мкг), нанограммах (нг) или пикограммах (пг) на килограмм (кг) массы тела индивидуума. Таким образом, суточная доза может составлять от около 1 мкг до около 100 мг.

[0113] В данном случае, эффективное количество аналога RLN в фармацевтической композиции может составлять от около 0,25 мг до около 5,0 мг. Однако специалисту в данной области техники понятно, что в некоторых случаях эффективное количество (*m.e.* доза/дозировка) может быть ниже нижнего предела указанного выше диапазона и быть более чем достаточным, в то время как в других случаях эффективное количество может представлять собой большие дозы и может применяться с приемлемыми побочными эффектами.

[0114] В дополнение к описанному в данном документе аналогу RLN фармацевтическая композиция также может содержать, по меньшей мере, один дополнительный терапевтический агент, в особенности терапевтический агент, обычно используемый в качестве стандарта лечения патологических состояний, заболеваний и нарушений сердечно-сосудистой системы, легких и почек.

[0115] Таким образом, фармацевтическая композиция может содержать эффективное количество, по меньшей мере, одного аналога RLN, описанного в данном документе, фармацевтически приемлемый носитель и, необязательно, по меньшей мере, один дополнительный терапевтический агент. Например, фармацевтическая композиция может содержать эффективное количество аналога RLN с последовательностью SEQ ID NO:24 и фармацевтически приемлемый носитель, эффективное количество аналога RLN с последовательностью SEQ ID NO:25 и фармацевтически приемлемый носитель, эффективное количество аналога RLN с последовательностью SEQ ID NO:26 и фармацевтически приемлемый носитель, эффективное количество аналога RLN с последовательностью SEQ ID NO:27 и фармацевтически приемлемый носитель, эффективное количество аналога RLN с последовательностью SEQ ID NO:28 и фармацевтически приемлемый носитель, эффективное количество аналога RLN с последовательностью SEQ ID NO:29 и фармацевтически приемлемый носитель, эффективное количество аналога RLN с последовательностью SEQ ID NO:30 и фармацевтически приемлемый носитель, эффективное количество аналога RLN с последовательностью SEQ ID NO:31 и фармацевтически приемлемый носитель, эффективное количество аналога RLN с последовательностью SEQ ID NO:32 и фармацевтически приемлемый носитель, эффективное количество аналога RLN с последовательностью SEQ ID NO:33 и фармацевтически приемлемый носитель, эффективное количество аналога RLN с последовательностью SEQ ID NO:34 и

фармацевтически приемлемый носитель, эффективное количество аналога RLN с последовательностью SEQ ID NO:35 и фармацевтически приемлемый носитель, эффективное количество аналога RLN с последовательностью SEQ ID NO:36 и фармацевтически приемлемый носитель, эффективное количество аналога RLN с последовательностью SEQ ID NO:37 и фармацевтически приемлемый носитель, эффективное количество аналога RLN с последовательностью SEQ ID NO:38 и фармацевтически приемлемый носитель или эффективное количество аналога RLN с последовательностью SEQ ID NO:39 и фармацевтически приемлемый носитель.

[0116] Альтернативно, аналоги RLN, описанные в данном документе, могут быть предложены как часть набора. В некоторых случаях набор содержит устройство для введения индивидууму, по меньшей мере, одного аналога RLN (и, необязательно, по меньшей мере, одного дополнительного терапевтического агента). В некоторых случаях набор содержит шприц и иглу для введения, по меньшей мере, одного аналога RLN (и, необязательно, по меньшей мере, одного дополнительного терапевтического агента). В конкретных случаях аналог RLN (и, необязательно, по меньшей мере, один дополнительный терапевтический агент) предварительно готовят в водном растворе внутри шприца.

[0117] *Способы Получения и Использования Аналогов RLN*

[0118] Описанные в данном документе аналоги RLN могут быть получены с помощью любого количества стандартных способов рекомбинантной ДНК или стандартных способов химического синтеза пептидов, известных в данной области техники. Что касается способов рекомбинантной ДНК, то можно использовать стандартные рекомбинантные технологии для конструирования полинуклеотида, имеющего последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность для аналога RLN, включения этого полинуклеотида в рекомбинантные векторы экспрессии и введения векторов в клетки-хозяева, такие как бактериальные клетки, дрожжевые клетки и клетки млекопитающих для получения аналога RLN. См., например, Green & Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 4th ed. 2012).

[0119] Что касается способов рекомбинантной ДНК, соединения, описанные в данном документе, могут быть получены путем продуцирования белка или молекулы белка-предшественника с использованием технологий рекомбинантной ДНК. ДНК, включая кДНК и синтетическую ДНК, может быть двухцепочечной или одноцепочечной, и ее кодирующие последовательности, которые кодируют соединение, описанное в данном

документе, могут разниться в результате избыточности или вырожденности генетического кода. Вкратце, последовательности ДНК, кодирующие описанные в данном документе соединения, вводят в клетку-хозяина для получения соединения или его предшественника. Клетки-хозяева могут представлять собой бактериальные клетки, такие как штаммы K12 или B *Escherichia coli*, грибковые клетки, такие как дрожжевые клетки, или клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (СНО).

[0120] Подходящую клетку-хозяина временно или стабильно трансфицируют или трансформируют системой экспрессии, такой как векторы экспрессии, для получения соединения, описанного в данном документе, или его предшественника. Векторы экспрессии, как правило, реплицируются в организмах-хозяевах либо в виде эписом, либо в виде неотъемлемой части хромосомной ДНК хозяина. Обычно векторы экспрессии будут содержать маркеры селекции, например, на тетрациклин, неомицин, G418 и дигидрофолатредуктазу, чтобы обеспечить возможность отбора тех клеток, которые трансформированы желаемыми последовательностями ДНК.

[0121] Могут быть использованы, не использованы или комбинированы в различных сочетаниях конкретные стадии биосинтеза или синтеза для каждой из описанных стадий, для получения соединений, описанных в данном документе.

[0122] Что касается способов химического синтеза пептидов, то можно использовать стандартные процедуры твердофазного синтеза в ручном или автоматизированном режиме. Например, автоматизированные синтезаторы пептидов коммерчески доступны от, например, Applied Biosystems (Фостер-Сити, Калифорния) и Protein Technologies Inc. (Тусон, штат Аризона). Реагенты для твердофазного синтеза легко доступны из коммерческих источников. Твердофазные синтезаторы можно использовать в соответствии с инструкциями производителя для блокирования мешающих групп, защиты аминокислот во время реакции, связывания, снятия защиты и кэпирования непрореагировавших аминокислот. Дополнительные сведения о создании синтетических RLN можно найти в патентах США № 4,835,251 и № 5,166,191.

[0123] Одно из применений аналогов RLN, описанных в данном документе, представляет собой лечение патологических состояний, заболеваний и/или нарушений сердечно-сосудистой системы. Иллюстративные патологические состояния, заболевания и нарушений сердечно-сосудистой системы включают, но не ограничиваются ими, острую сердечную недостаточность, хроническую сердечную недостаточность, атеросклероз, ишемическую болезнь сердца, диабет, инсульт, гиперхолестеринемию, гипертензию, ишемию, сужение кровеносных сосудов и гипертрофию желудочков.

[0124] Другое применение аналогов RLN, описанных в данном документе, представляет собой лечение патологических состояний, заболеваний и/или нарушений легких. Иллюстративные патологические состояния, заболевания и нарушения легких включают, но не ограничиваются ими, легочную гипертензию и хроническую обструктивную болезнь легких (ХОЗЛ).

[0125] Другое применение аналогов RLN, описанных в данном документе, представляет собой лечение патологических состояний, заболеваний и/или нарушений почек. Иллюстративные патологические состояния, заболевания и нарушения почек включают, но не ограничиваются ими, хроническое заболевание почек и диабетическую нефропатию.

[0126] Способы могут включать этапы, описанные в данном документе, и они могут, но не обязательно, выполняться в описанной последовательности. Однако возможны и другие последовательности выполнения. Более того, отдельно взятые или многочисленные этапы могут выполняться либо параллельно и/или с перекрытием во времени, и/или независимо или в многократно повторяемых этапах. Кроме того, способы могут включать дополнительные неуказанные этапы.

[0127] Таким образом, такие способы могут включать выбор индивидуума, имеющего патологическое состояние, заболевание или нарушение сердечно-сосудистой системы, или предрасположенного к нему. Альтернативно, способы могут включать выбор индивидуума, имеющего патологическое состояние, заболевание или нарушение легких, или предрасположенного к нему. Альтернативно, способы могут включать выбор индивидуума, имеющего патологическое состояние, заболевание или нарушение почек, или предрасположенного к нему. В некоторых случаях способы могут включать выбор индивидуума, который страдает диабетом, гипертензией с нарушением функции почек и/или страдает ожирением.

[0128] Способы также могут включать введение индивидууму эффективного количества, по меньшей мере, одного аналога RLN, описанного в данном документе, который может быть в форме фармацевтической композиции, как также описано в данном документе. В некоторых случаях аналог RLN/фармацевтическая композиция может содержать дополнительные терапевтические агенты, такие как антикоагулянт, ингибитор АПФ, БРА, ARNI, β -блокатор, диуретик, дигиталис, дигоксин, гидралазин/изосорбит динитрат, АМКР или другой антагонист альдостерона, ингибитор SGLT2, статины и/или антигликемический агент, а также другие терапевтические агенты для контроля сопутствующих заболеваний, включая, но не ограничиваясь этим, высокий уровень холестерина, высокое кровяное давление, мерцательную аритмию и диабет.

[0129] Концентрация/доза/дозировка аналога RLN и необязательного дополнительного терапевтического агента обсуждаются в другом месте данного документа.

[0130] Что касается пути введения, то аналог RLN или фармацевтическую композицию, содержащую его, можно вводить известными способами, такими как, например, перорально; с помощью инъекции (*т.е.* внутриартериально, внутривенно, внутривентрикулярно, интрацеребрально, интратекально, внутримышечно, внутривлагалищно, внутриматочным или внутримочевым); с помощью систем замедленного высвобождения или имплантируемых устройств. В некоторых случаях аналог RLN или фармацевтическую композицию, содержащую его, можно вводить п/к путем болюсной инъекции или непрерывно.

[0131] Что касается частоты дозирования то аналог RLN или фармацевтическую композицию, содержащую его, можно вводить ежедневно, через день, три раза в неделю, два раза в неделю, один раз в неделю (*т.е.* еженедельно), раз в две недели (*т.е.* каждые две недели) или ежемесячно. В некоторых случаях аналог RLN или фармацевтическую композицию, содержащую его, вводят п/к через день, п/к три раза в неделю, п/к два раза в неделю, п/к один раз в неделю, п/к каждые две недели или п/к ежемесячно. В конкретных случаях аналог RLN или фармацевтическую композицию, содержащую его, вводят п/к один раз в неделю (1 раз/нед.).

[0132] Что некоторых случаях аналог RLN или фармацевтическая композиция, содержащая его, вводятся в сочетании с эффективным количеством, по меньшей мере, одного дополнительного терапевтического агента. Дополнительный терапевтический агент можно вводить одновременно, отдельно или последовательно с аналогом RLN или фармацевтической композицией, содержащей его.

[0133] Более того, дополнительный терапевтический агент можно вводить с такой же частотой, что и аналог RLN или фармацевтическую композицию, содержащую его (*т. е.* через день, два раза в неделю или даже еженедельно). Альтернативно, дополнительный терапевтический агент можно вводить с частотой, отличной от частоты введения аналога RLN или фармацевтической композиции, содержащей его. В других случаях дополнительный терапевтический агент может быть введен п/к. В других случаях дополнительный терапевтический агент может быть введен в/в. В других случаях дополнительный терапевтический агент может быть введен перорально.

[0134] Также предполагается, что способы можно комбинировать с диетой и физическими упражнениями и/или можно комбинировать с дополнительными терапевтическими агентами, отличными от тех, которые обсуждались выше.

ПРИМЕРЫ

[0135] Нижеследующие неограничивающие примеры предложены в целях иллюстрации, а не ограничения.

[0136] ЭКСПРЕССИЯ ПОЛИПЕПТИДОВ

[0137] Пример 1: Рекombинантная Экспрессия RLN-Аналога 1

[0138] Пример 1 представляет собой аналог RLN, имеющий аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQQLYSALANKCCHVGCTKRSLAR
FCGGGSGGSGGGSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS

(SEQ ID NO:24).

[0139] В данном документе говорится о том, что аналог RLN с последовательностью SEQ ID NO:24 получают в системе экспрессии клеток млекопитающих с использованием производных клеток CHO K1. Последовательность кДНК, кодирующая последовательность SEQ ID NO:24, субклонируется в GS-содержащий остов плазмид экспрессии (плазмид на основе pEE12.4). Последовательность кДНК сливается по рамке считывания с кодирующей последовательностью последовательности сигнального пептида, METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO:44), для усиления секреции аналога RLN в среду для культивирования ткани. Экспрессия регулируется вирусным промотором CMV.

[0140] Для получения аналога RLN посредством временной трансфекции клетки CHO K1 трансфицируют рекомбинантной плазмиды экспрессии с использованием способа на основе использования ПЭИ. Вкратце, соответствующий объем суспензии клеток CHO K1 с плотностью 4×10^6 клеток/мл переносят во встряхиваемые колбы, и к клеткам добавляют как ПЭИ, так и рекомбинантную плазмидную ДНК. Клетки инкубируют в суспензионной культуре при 32°C в течение 6 дней. В конце периода инкубации клетки удаляют центрифугированием на низкой скорости, и белок аналога RLN очищают из кондиционированной среды.

[0141] В качестве альтернативы и для создания аналога RLN посредством стабильных трансфекций, клетки CHO K1 стабильно трансфицируют с использованием электропорации и соответствующего количества рекомбинантной плазмиды экспрессии, и трансфицированные клетки поддерживают в суспензионной культуре при подходящей плотности клеток. Отбор трансфицированных клеток осуществляют путем выращивания в

бессывороточной среде, содержащей 25 мкМ МСК, и инкубируют при около 35°C-37°C и около 5%-7% CO₂.

[0142] Аналог RLN секретируется в среду из клеток CHO, которые очищают с помощью аффинной хроматографии на основе белка А с последующей ионообменной и гидрофобной хроматографией или эксклюзионной хроматографией. Как правило, аналог RLN из собранной среды захватывается на смоле Mab Select Protein A (GE). Затем смолу быстро промывают рабочим буфером, таким как фосфатно-солевой буфер (ФСБ; pH 7,4), или буфером, содержащим Трис, для удаления неспецифически связанного материала. Белок элюируют из смолы раствором с низким pH, таким как 10 мМ лимонная кислота pH 3. Фракции, содержащие аналог RLN, объединяют и могут удерживаться при низком pH для инактивации потенциальных вирусов. pH мая быть нейтрализован добавлением основания, такого как 0,1 М Трис pH 8,0. Аналог RLN может быть дополнительно очищен с помощью ионообменной хроматографии с использованием смол, таких как Poros 50 HS (ThermoFisher). Аналог RLN элюируют из колонки с использованием градиента NaCl от 0 до 500 мМ в 20 мМ NaOAc, pH 5,0, посредством 15-ти объемов колонки.

[0143] Аналог RLN может быть дополнительно очищен хроматографией с гидрофобным взаимодействием с использованием колонки для хроматографии гидрофобного взаимодействия (ХГВ) Capto Phenyl ImpRes (GE Healthcare). Очистку выполняют путем доведения заряженного раствора колонки до около 0,5 М сульфата натрия и выполняют элюирование с использованием градиента 10-ти объемов колонки (ОК), переходящего от 0,5 М до 0 М сульфата натрия в 20 мМ растворе Трис с pH 8. После ХГВ аналог RLN может быть дополнительно очищен с помощью SEC путем загрузки концентрированного пула Capto Phenyl ImpRes на Superdex200 (GE Healthcare) с изократическим элюированием в ФСБ pH 7,4 или в 20 мМ гистидине, 50 мМ NaCl pH 6,0.

[0144] Очищенный аналог RLN может быть пропущен через удерживающий вирусы фильтр, такой как Planova 20N (Asahi Kasei Medical), с последующим концентрированием/диафильтрацией в 20 мМ гистидине, 20 мМ NaCl pH 6, с использованием ультрафильтрации в тангенциальном потоке на регенерированной целлюлозной мембране (Millipore).

[0145] Приведенные в данном документе аналоги RLN получают этим или подобным способом, что может быть легко определено специалистом в данной области техники.

[0146] Пример 2: Рекомбинантная Экспрессия RLN-аналога 2

[0147] Пример 2 представляет собой аналог RLN, имеющий аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSSPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAQLYSALANKCCHVGCTKR
SLARFCGGGSGGSGGSGGSMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS (SEQ ID NO:25).

[0148] В данном документе описано, что аналог RLN с последовательностью SEQ ID NO:25 создают, по существу, как описано в Примере 1, за исключением того, что в плазмиде экспрессии используется последовательность кДНК, которая кодирует последовательность SEQ ID NO:25.

[0149] Пример 3: Рекомбинантная Экспрессия RLN-Аналога 3

[0150] Пример 3 представляет собой аналог RLN, имеющий аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICG
MSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
(SEQ ID NO:26).

[0151] В данном документе описано, что аналог RLN с последовательностью SEQ ID NO:26 создают, по существу, как описано в Примере 1, за исключением того, что в плазмиде экспрессии используется последовательность кДНК, которая кодирует последовательность SEQ ID NO:26.

[0152] Пример 4: Рекомбинантная Экспрессия RLN-Аналога 4

[0153] Пример 4 представляет собой аналог RLN, имеющий аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSSPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQSWMEEVIKLCGRELVRAQI
AICGMSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC (SEQ ID NO:27).

[0154] В данном документе описано, что аналог RLN с последовательностью SEQ ID NO:27 создают, по существу, как описано в Примере 1, за исключением того, что в плазмиде экспрессии используется последовательность кДНК, которая кодирует последовательность SEQ ID NO:27.

[0155] Пример 5: Рекомбинантная Экспрессия RLN-Аналога 5

[0156] Пример 5 представляет собой аналог RLN, имеющий аминокислотную последовательность:

SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSL
ARFCGGGGGQGGGGGQGGGGGQGGGGQGGGGQEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR
YIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL
RPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGT LVT VSSPP (SEQ ID NO:28).

[0157] В данном документе описано, что аналог RLN с последовательностью SEQ ID NO:28 создают, по существу, как описано в Примере 1, за исключением того, что в плазмиде экспрессии используется последовательность кДНК, которая кодирует последовательность SEQ ID NO:28.

[0158] Пример 6: Рекомбинантная Экспрессия RLN-Аналога 6

[0159] Пример 6 представляет собой аналог RLN, имеющий аминокислотную последовательность:

SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSL
ARFCPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA
SGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM
NSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGT LVT VSSPP (SEQ ID NO:29).

[0160] В данном документе описано, что аналог RLN с последовательностью SEQ ID NO:29 создают, по существу, как описано в Примере 1, за исключением того, что в плазмиде экспрессии используется последовательность кДНК, которая кодирует последовательность SEQ ID NO:29.

[0161] Пример 7: Рекомбинантная Экспрессия RLN-Аналога 7

[0162] Пример 7 представляет собой аналог RLN, имеющий аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGK GREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTLVT VSSGGGGGQGGGGGQGGGGGQGGGGQSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICG
MSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC
(SEQ DI NO:30).

[0163] В данном документе описано, что аналог RLN с последовательностью SEQ ID NO:30 создают, по существу, как описано в Примере 1, за исключением того, что в плазмиде экспрессии используется последовательность кДНК, которая кодирует последовательность SEQ ID NO:30.

[0164] Пример 8: Рекомбинантная Экспрессия RLN-Аналога 8

[0165] Пример 8 представляет собой аналог RLN, имеющий аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGRFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSSPPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQSWMEEVIKLCGRELVRAQI
AICGMSTWSGGGSGGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC (SEQ ID NO:31).

[0166] В данном документе описано, что аналог RLN с последовательностью SEQ ID NO:31 создают, по существу, как описано в Примере 1, за исключением того, что в плазмиде экспрессии используется последовательность кДНК, которая кодирует последовательность SEQ ID NO:31.

[0167] Пример 9: Рекомбинантная Экспрессия RLN-Аналога 9

[0168] Пример 9 представляет собой аналог RLN, имеющий аминокислотную последовательность:

SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSGGGSGGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSL
ARFCGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR
YIDETAVAWFRQAPGKGRFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL
RPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGGQTLVTVSSPP (SEQ ID NO:32).

[0169] В данном документе описано, что аналог RLN с последовательностью SEQ ID NO:32 создают, по существу, как описано в Примере 1, за исключением того, что в плазмиде экспрессии используется последовательность кДНК, которая кодирует последовательность SEQ ID NO:32.

[0170] Пример 10: Рекомбинантная Экспрессия RLN-Аналога 10

[0171] Пример 10 представляет собой аналог RLN, имеющий аминокислотную последовательность:

SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSGGGSGGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSL
ARFCPPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA
SGRYIDETAVAWFRQAPGKGRFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM
NSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGGQTLVTVSSPP (SEQ ID NO:33).

[0172] В данном документе описано, что аналог RLN с последовательностью SEQ ID NO:33 создают, по существу, как описано в Примере 1, за исключением того, что в

плазмиде экспрессии используется последовательность кДНК, которая кодирует последовательность SEQ ID NO:33.

[0173] Пример 11: Рекомбинантная Экспрессия RLN-Аналога 11

[0174] Пример 11 представляет собой аналог RLN, имеющий аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICG
MSTWSGGGSGGSGGSGGGALANKCCHVGCTKRSLARFC

(SEQ ID NO:34).

[0175] В данном документе описано, что аналог RLN с последовательностью SEQ ID NO:34 создают, по существу, как описано в Примере 1, за исключением того, что в плазмиде экспрессии используется последовательность кДНК, которая кодирует последовательность SEQ ID NO:34.

[0176] Пример 12: Рекомбинантная Экспрессия RLN-Аналога 12

[0177] Пример 12 представляет собой аналог RLN, имеющий аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICG
MSTWSGGGSGGSGGSGGGALANKCCHVGCTKRSLARFC

(SEQ ID NO:35).

[0178] В данном документе описано, что аналог RLN с последовательностью SEQ ID NO:35 создают, по существу, как описано в Примере 1, за исключением того, что в плазмиде экспрессии используется последовательность кДНК, которая кодирует последовательность SEQ ID NO:35.

[0179] Пример 13: Рекомбинантная Экспрессия RLN-Аналога 13

[0180] Пример 13 представляет собой аналог RLN, имеющий аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG

QGTLLTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQALANKCCHVGCTKRSLARFCGG
 GSGGSGGGSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
 (SEQ ID NO:36).

[0181] В данном документе описано, что аналог RLN с последовательностью SEQ ID NO:36 создают, по существу, как описано в Примере 1, за исключением того, что в плазмиде экспрессии используется последовательность кДНК, которая кодирует последовательность SEQ ID NO:36.

[0182] Пример 14: Рекомбинантная Экспрессия RLN-Аналога 14

[0183] Пример 14 представляет собой аналог RLN, имеющий аминокислотную последовательность:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGK GREFVAGIGGGVDITY
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
 QGTLLTVSSPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQALANKCCHVGCTKRSLAR
 FCGGSGGSGGGSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS
 (SEQ ID NO:37).

[0184] В данном документе описано, что аналог RLN с последовательностью SEQ ID NO:37 создают, по существу, как описано в Примере 1, за исключением того, что в плазмиде экспрессии используется последовательность кДНК, которая кодирует последовательность SEQ ID NO:37.

[0185] Пример 15: Рекомбинантная Экспрессия RLN-Аналога 15

[0186] Пример 15 представляет собой аналог RLN, имеющий аминокислотную последовательность:

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
 QGTLLTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQDSWMEEVIKLCGRELVRAQIAIC
 GMSTWSSGGGGSGGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC (SEQ ID NO:38).

[0187] В данном документе описано, что аналог RLN с последовательностью SEQ ID NO:38 создают, по существу, как описано в Примере 1, за исключением того, что в плазмиде экспрессии используется последовательность кДНК, которая кодирует последовательность SEQ ID NO:38.

[0188] Пример 16: Рекомбинантная Экспрессия RLN-Аналога 16

[0189] Пример 16 представляет собой аналог RLN, имеющий аминокислотную последовательность:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSSPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPADSWMEEVIKLCGRELVRA
QIAICGMSTWSSGGGGSGGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC (SEQ ID NO:39).

[0190] В данном документе описано, что аналог RLN с последовательностью SEQ ID NO:39 создают, по существу, как описано в Примере 1, за исключением того, что в плазмиде экспрессии используется последовательность кДНК, которая кодирует последовательность SEQ ID NO:39.

[0191] АКТИВНОСТЬ *IN VITRO*

[0192] Пример 17: Анализ Связывания Альбумина Аналогом RLN с использованием ППР

[0193] Связывание *in vitro* аналога RLN с сывороточным альбумином человека, яванской макаки, мыши, крысы, свиньи, собаки, коровы и кролика определяют с помощью ППР. В частности, аффинность аналогов RLN из Примеров 1-14 к сывороточному альбумину этих видов кратко представлено ниже в Таблицах 1-14.

[0194] Связывание аналогов RLN из Примеров 1-14 с различными сывороточными альбуминами исследуется на приборе Biacore 8K. Иммобилизация сывороточного альбумина на поверхности сенсорного чипа серии S CM5 выполняется в соответствии с инструкциями производителя (Amine Coupling Kit BR-1000-50). Вкратце, карбоксильные группы на поверхностях сенсорного чипа (проточная кювета 1 и 2) активируются инъекцией 70 мкл смеси, содержащей 75 мг/мл EDC и 11,5 мг/мл NHS при 10 мкл/мин. Сывороточный альбумин человека, яванской макаки, мыши, крысы, свиньи, собаки, коровы и кролика разводят в 10 mM ацетата натрия, pH 4,0 (BR-1003-49) при 0,5, 0,5, 2,2, 0,6, 0,6, 0,8, 0,6 и 0,3 μ г/мл, а затем вводят через активированные поверхности чипа (проточная кювета 2, каналы с 1 по 8) со скоростью 10 мкл/мин в течение 180 секунд (сывороточный альбумин человека, мыши, крысы, свиньи и коровы получен от Sigma Aldrich (Сент-Луис, Миссури); сывороточный альбумин яванской макаки получен от Hölzel Diagnostika (Кельн, Германия); сывороточный альбумин собаки получен от Molecular Innovations (Нови, Мичиган); и сывороточный альбумин кролика получен от Fitzgerald Industries Intl. (Акстон, Массачусетс). Различные сывороточные альбумины ковалентно иммобилизованы через свободные амины на сенсорном чипе CM5, покрытом карбоксиметилдекстраном, с целью достижения поверхностной плотности около 100 (62-

145) единиц ответа. Избыточные реактивные группы на поверхностях (проточная кювета 1 и 2) дезактивируются путем введения 70 мкл 1 М ЕТА HCl-NaOH pH 8,5.

[0195] Аналоги RLN из Примеров с 1 по 14 разбавляют в буфере HBS-EP+ (10 mM ГЭПЭС pH 7,6, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,05% Полисорбат 20) в концентрациях 1000, 333,3, 111,1, 37,04, 12,35, 4,12, 1,37, 0,457, 0,152, 0,051 и 0,017 нМ. 150 μ л образца индивидуально вводят последовательно через иммобилизованные сывороточные альбумины на поверхности чипа и диссоциируют в течение 600 секунд при 50 μ л/мин при 25°C. Поверхность регенерируют, вводя 10 mM глицин-HCl pH 1,5 (BR-1003-54) при 50 μ л/мин в течении 100 сек. Полученные сенсограммы анализируются с использованием программного обеспечения Biacore 8K Insight Evaluation Software (версия 2.0.15.12933), подбирая модель кинетики связывания 1:1 для расчета кинетических параметров связывания - константы скорости ассоциации (k_a), константы скорости диссоциации (k_d) и равновесной константы диссоциации (K_D).

[0196] Таблица 1: Кинетика Связывания Аналога RLN из Примера 1 с Сывороточным Альбумином Человека, Яванской Макаки, Мыши, Крысы, Свиньи, Собаки, Коровы и Кролика при 25°C.

Связывание с Иммобилизованными Сывороточными Альбуминами (СА)	k_a (1/Мсек)	k_d (1/сек)	K_D (M)
СА Человека	9,8E+05	1,1E-04	1,1E-10
СА Яванской Макаки	1,1E+06	5,3E-04	5,0E-10
СА Мыши	1,3E+06	4,2E-03	3,3E-09
СА Крысы	1,2E+06	2,6E-03	2,1E-09
СА Свиньи	7,8E+05	5,5E-03	7,1E-09
СА Собаки	1,3E+06	1,5E-03	1,2E-09
СА Коровы	1,4E+06	5,0E-02	3,7E-08
СА Кролика	Связывание отсутствует		

[0197] K_D определяются как 0,1, 0,5, 3,3, 2,1, 7,1, 1,2 и 37 нМ при связывании сывороточного альбумина человека, яванской макаки, мыши, крысы, свиньи, собаки и коровы, соответственно, с аналогом RLN из Примера 1.

[0198] Таблица 2: Кинетика Связывания Аналога RLN из Примера 2 с Сывороточным Альбумином Человека, Яванской Макаки, Мыши, Крысы, Свиньи, Собаки, Коровы и Кролика при 25°C.

Связывание с Иммобилизованными Сывороточными Альбуминами (СА)	k_a (1/Мсек)	k_d (1/сек)	K_D (М)
СА Человека	9,2E+05	9,5E-05	1,0E-10
СА Яванской Макаки	1,2E+06	5,2E-04	4,5E-10
СА Мыши	1,1E+06	4,2E-03	3,8E-09
СА Крысы	9,8E+05	2,9E-03	3,0E-09
СА Свиньи	6,9E+05	5,6E-03	8,0E-09
СА Собаки	1,0E+06	1,5E-03	1,4E-09
СА Коровы	9,8E+05	4,9E-02	5,0E-08
СА Кролика	Связывание отсутствует		

[0199] K_D определяются как 0,1, 0,45, 3,8, 3,0, 8,0, 1,4 и 50 нМ при связывании сывороточного альбумина человека, яванской макаки, мыши, крысы, свиньи, собаки и коровы, соответственно, с аналогом RLN из Примера 2.

[0200] Таблица 3: Кинетика Связывания Аналога RLN из Примера 3 с Сывороточным Альбумином Человека, Яванской Макаки, Мыши, Крысы, Свиньи, Собаки, Коровы и Кролика при 25°C.

Связывание с Иммобилизованными Сывороточными Альбуминами (СА)	k_a (1/Мсек)	k_d (1/сек)	K_D (М)
СА Человека	1,4E+06	1,1E-04	7,6E-11
СА Яванской Макаки	1,5E+06	5,4E-04	3,6E-10
СА Мыши	1,7E+06	4,0E-03	2,4E-09
СА Крысы	1,7E+06	2,7E-03	1,6E-09
СА Свиньи	1,1E+06	5,3E-03	4,8E-09
СА Собаки	2,0E+06	1,4E-03	7,0E-10
СА Коровы	н/п (равновесное состояние)		2,6E-08
СА Кролика	Связывание отсутствует		

[0201] K_D определяются как 0,08, 0,36, 2,4, 1,6, 4,8, 0,7 и 26 нМ при связывании сывороточного альбумина человека, яванской макаки, мыши, крысы, свиньи, собаки и коровы, соответственно, с аналогом RLN из Примера 3.

[0202] Таблица 4: Кинетика Связывания Аналога RLN из Примера 4 с Сывороточным Альбумином Человека, Яванской Макаки, Мыши, Крысы, Свиньи, Собаки, Коровы и Кролика при 25°C.

Связывание с Имобилизованными Сывороточными Альбуминами (СА)	k_a (1/Мсек)	k_d (1/сек)	K_D (М)
СА Человека	1,2E+06	1,1E-04	8,9E-11
СА Яванской Макаки	1,3E+06	5,3E-04	4,2E-10
СА Мыши	1,3E+06	3,9E-03	3,0E-09
СА Крысы	1,2E+06	2,6E-03	2,1E-09
СА Свины	8,6E+05	5,3E-03	6,2E-09
СА Собаки	1,4E+06	1,4E-03	1,0E-09
СА Коровы	н/п (равновесное состояние)		3,7E-08
СА Кролика	Связывание отсутствует		

[0203] K_D определяются как 0,09, 0,42, 3,0, 2,1, 6,2, 1,0 и 37 нМ для связывания сывороточного альбумина человека, яванской макаки, мыши, крысы, свины, собаки и коровы, соответственно, с аналогом RLN из Примера 4.

[0204] Таблица 5: Кинетика Связывания Аналога RLN из Примера 5 с Сывороточным Альбумином Человека, Яванской Макаки, Мыши, Крысы, Свины, Собаки, Коровы и Кролика при 25°C.

Связывание с Имобилизованными Сывороточными Альбуминами (СА)	k_a (1/Мсек)	k_d (1/сек)	K_D (М)
СА Человека	5,8E+05	2,6E-04	4,5E-10
СА Яванской Макаки	8,2E+05	1,5E-03	1,8E-09
СА Мыши	5,9E+05	8,3E-03	1,4E-08
СА Крысы	7,0E+05	7,2E-03	1,0E-08
СА Свины	5,8E+05	1,3E-02	2,3E-08
СА Собаки	7,1E+05	3,4E-03	4,7E-09
СА Коровы	н/п (равновесное состояние)		1,2E-07
СА Кролика	Связывание отсутствует		

[0205] K_D определяются как 0,45, 1,8, 14, 10, 23, 4,7 и 120 нМ при связывании сывороточного альбумина человека, яванской макаки, мыши, крысы, свины, собаки и коровы, соответственно, с аналогом RLN из Примера 5.

[0206] Таблица 6: Кинетика Связывания Аналога RLN из Примера 6 с Сывороточным Альбумином Человека, Яванской Макаки, Мыши, Крысы, Свины, Собаки, Коровы и Кролика при 25°C.

Связывание с Имобилизованными Сывороточными Альбуминами (СА)	k_a (1/Мсек)	k_d (1/сек)	K_D (М)
СА Человека	4,7E+05	2,4E-04	5,1E-10
СА Яванской Макаки	4,3E+05	1,0E-03	2,3E-09
СА Мыши	6,3E+05	7,6E-03	1,2E-08
СА Крысы	4,9E+05	4,8E-03	9,7E-09
СА Свины	4,1E+05	9,9E-03	2,4E-08
СА Собаки	4,8E+05	2,0E-03	4,1E-09
СА Коровы	н/п (равновесное состояние)		1,3E-07
СА Кролика	Связывание отсутствует		

[0207] K_D определяются как 0,51, 2,3, 12, 9,7, 24, 4,1 и 130 нМ при связывании сывороточного альбумина человека, яванской макаки, мыши, крысы, свины, собаки и коровы, соответственно, с аналогом RLN из Примера 6.

[0208] Таблица 7: Кинетика Связывания Аналога RLN из Примера 7 с Сывороточным Альбумином Человека, Яванской Макаки, Мыши, Крысы, Свины, Собаки, Коровы и Кролика при 25°C.

Связывание с Имобилизованными Сывороточными Альбуминами (СА)	k_a (1/Мсек)	k_d (1/сек)	K_D (М)
СА Человека	1,9E+06	1,2E-04	6,3E-11
СА Яванской Макаки	2,1E+06	5,9E-04	2,9E-10
СА Мыши	2,0E+06	4,1E-03	2,1E-09
СА Крысы	2,0E+06	2,8E-03	1,4E-09
СА Свины	1,5E+06	5,4E-03	3,7E-09
СА Собаки	2,2E+06	1,5E-03	6,9E-10
СА Коровы	н/п (равновесное состояние)		2,5E-08
СА Кролика	Связывание отсутствует		

[0209] K_D определяются как 0,06, 0,29, 2,1, 1,4, 3,7, 0,69 и 25 нМ при связывании сывороточного альбумина человека, яванской макаки, мыши, крысы, свины, собаки и коровы, соответственно, с аналогом RLN из Примера 7.

[0210] Таблица 8: Кинетика Связывания Аналога RLN из Примера 8 с Сывороточным Альбумином Человека, Яванской Макаки, Мыши, Крысы, Свины, Собаки, Коровы и Кролика при 25°C.

Связывание с Имобилизованными Сывороточными Альбуминами (СА)	k_a (1/Мсек)	k_d (1/сек)	K_D (М)
СА Человека	1,5E+06	1,1E-04	7,8E-11
СА Яванской Макаки	1,9E+06	5,9E-04	3,2E-10
СА Мыши	2,2E+06	3,9E-03	1,8E-09
СА Крысы	1,6E+06	2,8E-03	1,7E-09
СА Свиньи	1,3E+06	5,2E-03	4,1E-09
СА Собаки	2,3E+06	1,5E-03	6,6E-10
СА Коровы	н/п (равновесное состояние)		2,1E-08
СА Кролика	Связывание отсутствует		

[0211] K_D определяются как 0,08, 0,32, 1,8, 1,7, 4,1, 0,66 и 21 нМ при связывании сывороточного альбумина человека, яванской макаки, мыши, крысы, свиньи, собаки и коровы, соответственно, с аналогом RLN из Примера 8.

[0212] Таблица 9: Кинетика Связывания Аналога RLN из Примера 9 с Сывороточным Альбумином Человека, Яванской Макаки, Мыши, Крысы, Свиньи, Собаки, Коровы и Кролика при 25°C.

Связывание с Имобилизованными Сывороточными Альбуминами (СА)	k_a (1/Мсек)	k_d (1/сек)	K_D (М)
СА Человека	9,5E+05	1,8E-04	1,9E-10
СА Яванской Макаки	1,1E+06	9,4E-04	8,6E-10
СА Мыши	1,2E+06	1,1E-02	9,5E-09
СА Крысы	9,1E+05	7,5E-03	8,2E-09
СА Свиньи	8,7E+05	1,2E-02	1,4E-08
СА Собаки	9,5E+05	3,6E-03	3,8E-09
СА Коровы	н/п (равновесное состояние)		8,4E-08
СА Кролика	Связывание отсутствует		

[0213] K_D определяются как 0,19, 0,86, 9,5, 8,2, 14, 3,8 и 84 нМ при связывании сывороточного альбумина человека, яванской макаки, мыши, крысы, свиньи, собаки и коровы, соответственно, с аналогом RLN из Примера 9.

[0214] Таблица 10: Кинетика Связывания Аналога RLN из Примера 10 с Сывороточным Альбумином Человека, Яванской Макаки, Мыши, Крысы, Свиньи, Собаки, Коровы и Кролика при 25°C.

Связывание с Иммобилизованными Сывороточными Альбуминами (СА)	k_a (1/Мсек)	k_d (1/сек)	K_D (М)
СА Человека	5,5E+05	2,0E-04	3,7E-10
СА Яванской Макаки	5,1E+05	7,7E-04	1,5E-09
СА Мыши	7,4E+05	7,2E-03	9,7E-09
СА Крысы	6,3E+05	4,9E-03	7,8E-09
СА Свиньи	4,9E+05	9,6E-03	2,0E-08
СА Собаки	6,3E+05	2,1E-03	3,4E-09
СА Коровы	н/п (равновесное состояние)		1,0E-07
СА Кролика	Связывание отсутствует		

[0215] K_D определяются как 0,37, 1,5, 9,7, 7,8, 20, 3,4 и 100 нМ при связывании сывороточного альбумина человека, яванской макаки, мыши, крысы, свиньи, собаки и коровы, соответственно, с аналогом RLN из Примера 10.

[0216] Таблица 11: Кинетика Связывания Аналога RLN из Примера 11 с Сывороточным Альбумином Человека, Яванской Макаки, Мыши, Крысы, Свиньи, Собаки, Коровы и Кролика при 25°C.

Связывание с Иммобилизованными Сывороточными Альбуминами (СА)	k_a (1/Мсек)	k_d (1/сек)	K_D (М)
СА Человека	1,2E+06	2,1E-04	1,7E-10
СА Яванской Макаки	1,3E+06	6,4E-04	4,8E-10
СА Мыши	1,4E+06	5,0E-03	3,6E-09
СА Крысы	2,1E+06	2,8E-03	1,3E-09
СА Свиньи	8,5E+05	6,2E-03	7,3E-09
СА Собаки	1,4E+06	1,7E-03	1,3E-09
СА Коровы	н/п (равновесное состояние)		2,7E-08
СА Кролика	Связывание отсутствует		

[0217] K_D определяются как 0,17, 0,48, 3,6, 1,3, 7,3, 1,3 и 27 нМ при связывании сывороточного альбумина человека, яванской макаки, мыши, крысы, свиньи, собаки и коровы, соответственно, с аналогом RLN из Примера 11.

[0218] Таблица 12: Кинетика Связывания Аналога RLN из Примера 12 с Сывороточным Альбумином Человека, Яванской Макаки, Мыши, Крысы, Свиньи, Собаки, Коровы и Кролика при 25°C.

Связывание с Иммобилизованными Сывороточными Альбуминами (СА)	k_a (1/Мсек)	k_d (1/сек)	K_D (М)
СА Человека	1,4E+06	1,9E-04	1,4E-10
СА Яванской Макаки	1,5E+06	7,0E-04	4,7E-10
СА Мыши	1,8E+06	4,9E-03	2,6E-09
СА Крысы	2,0E+06	3,3E-03	1,7E-09
СА Свиньи	1,4E+06	5,8E-03	4,2E-09
СА Собаки	2,1E+06	1,6E-03	7,7E-10
СА Коровы	н/п (равновесное состояние)		3,0E-08
СА Кролика	Связывание отсутствует		

[0219] K_D определяются как 0,14, 0,47, 2,6, 1,7, 4,2, 0,77 и 30 нМ при связывании сывороточного альбумина человека, яванской макаки, мыши, крысы, свиньи, собаки и коровы, соответственно, с аналогом RLN из Примера 12.

[0220] Таблица 13: Кинетика Связывания Аналога RLN из Примера 13 с Сывороточным Альбумином Человека, Яванской Макаки, Мыши, Крысы, Свиньи, Собаки, Коровы и Кролика при 25°C.

Связывание с Иммобилизованными Сывороточными Альбуминами (СА)	k_a (1/Мсек)	k_d (1/сек)	K_D (М)
СА Человека	1,4E+06	1,9E-04	1,4E-10
СА Яванской Макаки	1,4E+06	7,0E-04	4,9E-10
СА Мыши	1,8E+06	4,8E-03	2,6E-09
СА Крысы	1,7E+06	3,3E-03	2,0E-09
СА Свиньи	1,2E+06	6,0E-03	5,0E-09
СА Собаки	1,9E+06	1,7E-03	9,2E-10
СА Коровы	н/п (равновесное состояние)		2,9E-08
СА Кролика	Связывание отсутствует		

[0221] K_D определяются как 0,14, 0,49, 2,6, 2,0, 5,0, 0,92 и 29 нМ при связывании сывороточного альбумина человека, яванской макаки, мыши, крысы, свиньи, собаки и коровы, соответственно, с аналогом RLN из Примера 13.

[0222] Таблица 14: Кинетика Связывания Аналога RLN из Примера 14 с Сывороточным Альбумином Человека, Яванской Макаки, Мыши, Крысы, Свиньи, Собаки, Коровы и Кролика при 25°C.

Связывание с Иммобилизованными Сывороточными Альбуминами (СА)	k_a (1/Мсек)	k_d (1/сек)	K_D (М)
СА Человека	1,2E+06	1,9E-04	1,6E-10
СА Яванской Макаки	1,1E+06	6,8E-04	6,1E-10
СА Мыши	1,5E+06	4,6E-03	3,1E-09
СА Крысы	1,4E+06	3,2E-03	2,2E-09
СА Свины	9,7E+05	5,8E-03	6,0E-09
СА Собаки	1,5E+06	1,7E-03	1,1E-09
СА Коровы	н/п (равновесное состояние)		3,4E-08
СА Кролика	Связывание отсутствует		

[0223] K_D определяются как 0,16, 0,61, 3,1, 2,2, 6,0, 1,1 и 34 нМ при связывании сывороточного альбумина человека, яванской макаки, мыши, крысы, свины, собаки и коровы, соответственно, с аналогом RLN из Примера 14.

[0224] Пример 18: Эффективность *in vitro* аналога RLN в отношении рецепторов RXFP1 и RXFP2

[0225] Создание линии клеток CHO-CRE-Luc: клетки CHO-K1 (ATCC) культивируют в DMEM-F12 3:1 с 5% ФБС с 20 мМ ГЭПЭС, 40 мкг/мл L-пролина, 1x раствором антибиотиков и разделяют 1:5 каждые 2-3 дня с использованием фермента TrypLE™ Express (Gibco). Клетки трансфицируют с использованием плазмидной ДНК pGL4.29 [luc2P/CRE/Hygro] (Promega) и Fugene HD (Promega) в соответствии с инструкциями производителя. Трансфицированные клетки отбирают с помощью селекции на гигромицине В в концентрации 1 мг/мл в течение 3-4 недель. Клональные линии получают путем клонирования с ограниченным разведением в 96-луночных планшетах и подтверждают реакцией на форсколин с помощью анализа репортерного гена люциферазы с реагентом Bright-Glo (Promega). Клоны размножают, собирают, ресуспендируют в среде для заморозки клеток, аликвотируют в криобирки и хранят в жидком азоте для длительного хранения. Лучшую линию клеток с выраженными антителопродуцирующими свойствами отобрали на основе наилучшего ответа на форсколин (соотношение сигнала к фону), клональная линия № 2B6, для последующей трансфекции с использованием рецепторов RXFP1 и RXFP2 человека.

[0226] Создание линий клеток, экспрессирующих RXFP1 человека и RXFP2 человека: клетки CHO-CRE-Luc линии № 2B6 культивируют в DMEM-F12 3:1 с 5% ФБС с 20 мМ ГЭПЭС, 40 мкг/мл L-пролина, 1x раствором антибиотиков, 1 мг/мл гигромицина В и

разделяют 1:5 каждые 2-3 дня с помощью фермента TrypLE Express (Gibco). Клетки трансфицируют с использованием плазмидной ДНК рецептора RXFP1 человека или рецептора RXFP2 человека и Eugene HD (Promega) в соответствии с инструкциями производителя. Трансфицированные клетки отбирают помощью селекции на гигромицине В (1 мг/мл) и пурамицине (6 мкг/мл) в течение 3-4 недель. Клональные линии получают клонированием с ограниченным разведением в 96-луночных планшетах. Клональные линии подтверждали путем ответа на RLN2 человека. Клоны размножают, собирают, ресуспендируют в среде для заморозки клеток, аликвотируют в криопробирки и хранят замороженными в жидком азоте для длительного хранения. Клональные линии отбираются на основе наилучшего ответа на RLN2 человека (соотношение сигнала к фону) для проверки достоверности анализа.

[0227] Анализ репортерного гена люциферазы рецепторов RXFP1 и RXFP2 человека: линии клеток CHO, экспрессирующие RXFP1 человека или RXFP2 человека, культивируют в селективной среде (DMEM-F12 3:1 с 5% ФБС с 20 мМ ГЭПЭС, 40 мкг/мл L-пролина, 1х раствором антибиотиков, 6 мкг/мл пурамицина, 1 мг/мл гигромицина В). В День -1 (за день до анализа репортерного гена люциферазы cAMP CRE) клетки один раз промывали ФСБ, извлекали из колб с раствором для диссоциации клеток (раствор для диссоциации клеток, не содержащий ферментов, GIBCO каталожный номер 13151-014:TrypLE™ Express = 30: 1) и ресуспендировали в среде для культивирования в бактериологических чашках (DMEM-F12 3:1 с 20 мМ ГЭПЭС, 1х раствором антибиотиков, 0,5% ФБС). Клетки высевают в 96-луночный планшет (Falcon, каталожный номер 353219) из расчета 20,000 клеток/0,1 мл/лунку. Клетки культивировали в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ в течение ночи. В День 1 (день анализа репортерного гена люциферазы cAMP CRE) среду удаляют и заменяют на 90 мкл бессывороточной среды (DMEM-F12 3:1 с 20 мМ ГЭПЭС, 1х раствором антибиотиков). Планшеты инкубируют при 37 °C в течение 2 часов, затем добавляют 10 мкл 10х лиганда (RLN2, конечный 1х). Планшеты инкубируют еще 4 часа при 37°C. По окончании инкубационного периода чашки доводят до комнатной температуры в течении 15 мин. Затем в каждую лунку добавляют 50 мкл Bright-Glo™ и планшеты анализируют с использованием считывающего устройства Biotek Neo2 с программным обеспечением Gen5.

[0228] Статистический анализ данных: данные импортируются из считывающего устройства Biotek Neo2 в программное обеспечение GraphPad Prism® (GraphPad Software, LLC; Ла-Холья, Калифорния; версия 7). Получали значение EC₅₀ из кривой четырехпараметрической зависимости доза-ответ с переменным коэффициентом наклона.

[0229] Таблица 15: Эффективность *In Vitro* Аналогов RLN в Отношении Рецепторов RXP1 и RXP2.

Соединение	SEQ ID NO:	EC ₅₀ hRXFP1, нМ, Геометрическое Среднее	SEM (стандартная ошибка среднего)	N	EC ₅₀ hRXFP2, нМ, Геометрическое Среднее	SEM (стандартная ошибка среднего)	N	R2/R1 соотношение
hRLN2	5 и 6	0,15	0,012	4	1,7	0,45	8	11
Пример 1	24	3,0	2,8	6	65	17	2	22
Пример 2	25	1,1	0,64	6	79	6,2	2	74
Пример 3	26	4,0	1,0	2	19	2,4	4	5
Пример 4	27	2,9	0,2	2	24	6,0	4	8
Пример 5	28	8,1	2,9	2	98	16	4	12
Пример 6	29	15	3,0	2	39	4,9	4	3
Пример 7	30	0,91	0,04	2	26	2,5	4	28
Пример 8	31	2,0	1,2	2	32	14	4	16
Пример 9	32	5,2	0,01	2	97	14	4	19
Пример 10	33	14	0,33	2	32	3,9	4	2
Пример 11	34	3,2	0,69	2	207	31	4	65
Пример 12	35	2,9	0,51	2	193	29	4	66
Пример 13	36	10	0,8	2	407	17	3	42
Пример 14	37	17	2,3	2	628	51	3	37
Пример 15	38	1,7	0,13	5	23	3,6	4	14
Пример 16	39	2,0	0,22	4	70	23	2	35

[0230] АКТИВНОСТЬ *IN VIVO*

[0231] Пример 19: Фармакокинетика Аналогов RLN у Самцов Крыс Линии Спраг-Доули

[0232] Самцам крыс линии Спраг-Доули вводят п/к однократную дозу 200 нмоль/кг аналога RLN в буфере His-NaCl (pH 6,0) в объеме 1,0 мл/кг. Кровь собирают через 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 и 240 часов после введения дозы для фармакокинетической характеристики.

[0233] Концентрации аналогов RLN в плазме определяют с помощью аттестованного способа ЖХ/МС в Eli Lilly and Company. Соединения из Примеров и аналоговый внутренний стандарт экстрагируют из 100% плазмы крысы с использованием антитела против RLN человека с последующим обнаружением N-концевого триптического пептида с использованием масс-спектрометра Q-Exactive™ Orbitrap®.

[0234] Данные для аналогов RLN из Примеров 4 и 7 представлены ниже в Таблице 16.

[0235] Таблица 16: Средние Фармакокинетические Параметры в Плазме для Аналогов RLN После Однократной П/К Дозы 200 нмоль/кг у Самцов Крыс Линии Спраг-Доули.

Соединение	Идентификационный номер животного	$t_{1/2}$ (ч)	T_{max} (ч)	C_{max} (нмоль/л)	AUC_{0-inf} (ч*нмоль/л)	CL/F (мл/ч/кг)
Пример 4	1	28,0	72	297	35510	5,63
	2	28,8	48	368	37529	5,33
	3	32,8	48	356	39220	5,10
	Среднее	29,9	56	340	37419	5,35
	SD	2,6	14	38	1857	0,27
Пример 7	1	40,1	48	387	51939	3,85
	2	37,9	72	487	57843	3,46
	3	31,3	48	344	44409	4,50
	Среднее	36,4	56	406	51397	3,94
	SD	4,6	14	74	6734	0,53

[0236] ПРИМЕЧАНИЕ: Сокращения: $t_{1/2}$ = период полувыведения, T_{max} = время максимальной концентрации, C_{max} = максимальная наблюдаемая концентрация в плазме, AUC_{0-inf} = площадь под кривой от точки времени 0 часов до бесконечности, CL/F = клиренс/биодоступность, N = 3 животных/группу/момент времени.

[0237] Как представлено в Таблице 16, аналоги RLN из Примеров 4 и 7 демонстрируют расширенный фармакокинетический профиль у крыс линии Спраг-Дули.

[0238] Пример 20. Влияние *In Vivo* Аналогов RLN на Почечный Кровоток После В/В Введения Самцам Крыс Линии Спраг-Дули

[0239] Самцов крыс линии Спраг-Дули возрастом в пять недель (Charles River Laboratories, Inc.) помещают в виварий с обычным циклом дня/ночи в течение одной недели до начала эксперимента. Затем крыс рандомизируют в следующие группы лечения: носитель (20 mM His/20 mM NaCl, буфер с pH 6,0) и аналог RLN из Примера 7 в зависимости от массы тела. Аналог RLN вводят в дозе 2,44 мкг/кг с помощью в/в болюсного введения с последующей в/в инфузией 0,36 мкг/кг/ч, в дозе 8,13 мкг/кг с помощью в/в болюсного введения с последующей в/в инфузией 1,2 мкг/кг/ч, в дозе 24,4 мкг/кг с помощью в/в болюсного введения с последующей в/в инфузией 3,6 мкг/кг/ч, и в дозе 81,3 мкг/кг с помощью в/в болюсного введения с последующей в/в инфузией 11,9 мкг/кг/ч.

[0240] Чтобы оценить влияние аналога RLN на почечный кровоток, крыс анестезируют с использованием уретана (1,2 г/кг, в/б) и готовят к ультразвуковому сканированию брюшной полости/почек и измерениям кровотока в почечной артерии с помощью импульснoволновой доплерографии (VisualSonics, ультразвуковая система, Модель Vevo 3100; Fujifilm). Катетер длительного использования помещается в хвостовую вену для в/в болюсного введения и инфузии. После 30-минутного периода акклиматизации измеряется

исходный уровень почечного кровотока, и уровень почечного кровотока измеряется через 3 часа после начала дозирования.

[0241] Таблица 17: Влияние Вводимого В/В Аналога RLN на Почечный Кровоток у Здоровых Крыс.

Соединение и Доза	Время	Почечный Кровоток (мл/мин)	Процентное Изменение от Носителя (%)
Носитель при в/в болюсном введении 1,6 мл/кг с последующей в/в инфузией 0,475 мл/кг/ч	исходный уровень	8,58 ± 0,16	
	через 3 ч	8,56 ± 0,18	--
Аналог RLN из Примера 7 при в/в болюсном введении 2,44 мкг/кг с последующей в/в инфузией 0,36 мкг/кг/ч	исходный уровень	8,49 ± 0,31	
	через 3 ч	8,59 ± 0,33	0,4
Аналог RLN из Примера 7 при в/в болюсном введении 8,13 мкг/кг с последующей в/в инфузией 1,2 мкг/кг/ч	исходный уровень	8,63 ± 0,44	
	через 3 ч	10,84 ± 0,53†*	26,3
Аналог RLN из Примера 7 при в/в болюсном введении 24,4 мкг/кг с последующей в/в инфузией 3,6 мкг/кг/ч	исходный уровень	8,54 ± 0,23	
	через 3 ч	12,74 ± 0,37†*	48,8
Аналог RLN из Примера 7 при в/в болюсном введении 81,3 мкг/кг с последующей в/в инфузией 11,9 мкг/кг/ч	исходный уровень	8,34 ± 0,15	
	через 3 ч	13,73 ± 0,47†*	60,4

[0242] ПРИМЕЧАНИЕ: результаты выражены как Среднее Значение ± Стандартное Отклонение, † значимо отличаются от исходного уровня $p < 0,001$ ANOVA, * значимо отличаются от носителя ANOVA $p < 0,001$, N = 5 на группу лечения.

[0243] Как видно из Таблицы 17, аналог RLN из Примера 7 значительно увеличивает почечный кровоток в группах при в/в болюсном введении 8,13 мкг/кг с последующей в/в инфузией 1,2 мкг/кг/ч, при в/в болюсном введении 24,4 мкг/кг с последующей в/в инфузией 3,6 мкг/кг/ч, при и в/в болюсном введении 81,3 мкг/кг с последующей в/в инфузией 11,9 мкг/кг/ч, на 26,6, 48,8 и 60,4% после 3-часового воздействия.

[0244] Пример 21. Влияние *In Vivo* Аналогов RLN на Почечный Кровоток После П/К Введения Самцам Крыс Линии Спраг-Дули

[0245] Самцов крыс линии Спраг-Дули возрастом в пять недель (Charles River Laboratories, Inc.) помещают в виварий с обычным циклом дня/ночи в течение одной недели до начала эксперимента. Затем крыс рандомизируют в следующие группы

лечения: носитель (20 мМ His/20 мМ NaCl, буфер с pH 6,0) и аналог RLN из Примера 7 в зависимости от массы тела. Аналог RLN представляет собой введенную п/к дозу в 180 мкг/кг.

[0246] Чтобы оценить влияние аналога RLN на почечный кровоток, через 48 часов после введения дозы крыс анестезируют с использованием уретана (1,2 г/кг, в/б) и готовят к ультразвуковому сканированию брюшной полости/почек и измерениям кровотока в почечной артерии с помощью импульсно-волновой доплерографии (VisualSonics, ультразвуковая система, Модель Vevo 3100; Fujifilm). После 30-минутного периода акклиматизации производятся измерения почечного кровотока.

[0247] Таблица 18: Влияние Вводимого П/К Аналога RLN на Почечный Кровоток у Здоровых Крыс.

Соединение и Доза	Почечный Кровоток (мл/мин)	Процентное Изменение от Носителя (%)
Носитель при дозе 5 мл/кг	8,51 ± 0,33	--
Аналог RLN из Примера 7 при дозе 180 мкг/кг	11,27 ± 0,81*	32,4

[0248] ПРИМЕЧАНИЕ: результаты выражены как Среднее Значение ± Стандартное Отклонение, * значимо отличаются от носителя ANOVA $p < 0,001$, N = 10 на группу лечения.

[0249] Как видно из Таблицы 18, аналог RLN из Примера 7 значительно увеличивает почечный кровоток после 48 часов воздействия при введении п/к дозы 180 мкг/кг.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

[0250] В раскрытие данного изобретения включены ссылки на нижеследующие нуклеиновые и/или аминокислотные последовательности, и они приводятся ниже для справки.

[0251] SEQ ID NO:1 – про-RLN1 человека

MPRLFLFHLLEFCLLLNQFSRAVAAKWDDVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSKRSLSQ
EDAPQTPRPVAEIVPSFINKDTETIIIMLEFIANLPPELKAALSERQPSLPQLQQYVPALKDS
NLSFEFEFKKLIRNRQSEAADSNPSELKYLGLDTHSQKKRRPYVALFEKCCLIGCTKRSLA
KYC

[0252] SEQ ID NO:2 – А-цепь RLN1 человека

PYVALFEKCCLIGCTKRSLAKYC

[0253] SEQ ID NO:3 – В-цепь RLN1 человека

VAAKWDDVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS

[0254] SEQ ID NO:4 - про-RLN2 человека

MPRLFFFHLLGVCLLLNQFSRAVADSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSKRSLSQ
EDAPQTPRPVAEIVPSFINKDTETINMMSEFVANLPQELKLTSEMQLPALPQLQQHVPVL
KDSSLLFEFEFKKLIRNRQSEAADSSPSELKYLGLDTHSRKKRQLYSALANKCCHVGCTK
RSLARFC

[0255] SEQ ID NO:5 – А-цепь RLN2 человека

QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

[0256] SEQ ID NO:6 – В-цепь RLN2 человека

DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS

[0257] SEQ ID NO:7 - про-RLN3 человека

MARYMLLLLLAVWVLTGELWPGAEARAAPYGVRLCGREFIRAVIFTCGGSRWRRSDIL
AHEAMGDTFPDADADEDLAGELDEAMGSSEWLALTKSPQAFYRGRPSWQGTPGVLR
GSRDVLAGLSSSCCKWGCSKSEISSLC

[0258] SEQ ID NO:8 – А-цепь RLN3 человека
 DVLAGLSSSCCKWGCSKSEISLC

[0259] SEQ ID NO:9 – В-цепь RLN3 человека
 RAAPYGVRLCGREFIRAVIFTCGGSRW

[0260] SEQ ID NO:10 – фрагмент VHH №1 (C22)
 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
 QGTLVTVSS

[0261] SEQ ID NO:11 – фрагмент VHH №2 (C22.43)
 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
 QGTLVTVSSPP

[0262] SEQ ID NO:12 – фрагмент VHH №3 (C80)
 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGK GREFVAGIGGGVDITY
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
 QGTLVTVSS

[0263] SEQ ID NO:13 – фрагмент VHH №4 (C80.43)
 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGK GREFVAGIGGGVDITY
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
 QGTLVTVSSPP

[0264] SEQ ID NO:14 – L₁ (основная последовательность (GGGGQ)_n)
 GGGGQ

[0265] SEQ ID NO:15 – L₁ (основная последовательность (GGGQ)_n)
 GGGQ

[0266] SEQ ID NO:16 – L₁ (основная последовательность (GGGS)_n)
GGGS

[0267] SEQ ID NO:17 – L₁ (основная последовательность (PGPQ)_n)
PGPQ

[0268] SEQ ID NO:18 – L₁ (основная последовательность (PGPA)_n)
PGPA

[0269] SEQ ID NO:19 – L₁ №1 ((GGGGQ)₅)
GGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQ

[0270] SEQ ID NO:20 – L₁ №2 ((PGPQ)₈)
PGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQ

[0271] SEQ ID NO:21 – L₁ №3 (PGPA)₈
PGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPA

[0272] SEQ ID NO:22 – L₂ №1
GGGSGGSGGG

[0273] SEQ ID NO:23 – L₂ №2
GGGSGGSGGSGGG

[0274] SEQ ID NO:24 – Аналог RLN2 №1 (C22-(G4Q)₅-A10B(desB1)RLN)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGT LVT VSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQQLYSALANKCCHVGCTKRSLAR
FCGGGSGGSGGGSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS

[0275] SEQ ID NO:25 – Аналог RLN2 №2 (C22-(PGPA)₈-A10B(desB1)RLN)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSSPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAQLYSALANKCCHVGCTKR
SLARFCGGGSGGSGGGSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS

[0276] SEQ ID NO:26 – Аналог RLN2 №3 (C22-(G4Q)₅-B10A(desB1)RLN)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICG
MSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

[0277] SEQ ID NO:27 – Аналог RLN2 №4 (C22-(PGPQ)₈-B10A(desB1)RLN)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSSPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQSWMEEVIKLCGRELVRAQI
AICGMSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

[0278] SEQ ID NO:28 – Аналог RLN2 №5 (B10A(desB1)RLN-(G4Q)₅-C22.43)

SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSL
ARFCGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR
YIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL
RPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGTLVTVSSPP

[0279] SEQ ID NO:29 – Аналог RLN2 №6 (B10A(desB1)RLN-(PGPQ)₈-C22.43)

SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSL
ARFCPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA
SGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM
NSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGTLVTVSSPP

[0280] SEQ ID NO:30 – Аналог RLN2 №7 (C80-(G4Q)₅-B10A(desB1)RLN)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICG
MSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

[0281] SEQ ID NO:31 – Аналог RLN2 №8 (C80-(PGPQ)₈-B10A(desB1)RLN)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSSPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQSWMEEVIKLCGRELVRAQI
AICGMSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

[0282] SEQ ID NO:32 – Аналог RLN2 №9 (B10A(desB1)RLN-(G4Q)₅-C80.43)

SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSL
ARFCGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR
YIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL
RPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGTLVTVSSPP

[0283] SEQ ID NO:33 – Аналог RLN2 №10 (B10A(desB1)RLN-(PGPQ)₈-C80.43)

SWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSGGGSGGSGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSL
ARFCPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA
SGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM
NSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWGQGTLVTVSSPP

[0284] SEQ ID NO:34 – Аналог RLN2 №11 (C22-(G4Q)₅-B13A(desB1, desA1-4)RLN)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICG
MSTWSGGGSGGSGGSGGGALANKCCHVGCTKRSLARFC

[0285] SEQ ID NO:35 – Аналог RLN2 №12 (C80-(G4Q)₅-B13A(desB1, desA1-4)RLN)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICG
MSTWSGGGSGGSGGSGGGALANKCCHVGCTKRSLARFC

[0286] SEQ ID NO:36 – Аналог RLN2 №13 (C80-(G4Q)₅-A10B(desB1, desA1-4)RLN)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKGREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG

QGT LVT VSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQALANKCCHVGCTKRSLARFCGG
GSGGSGGGSWMEEVIKLCGREL VRAQIAICGMSTWS

[0287] SEQ ID NO:37 – Аналог RLN2 №14 (C80-(PGPQ)₈-A10B(desB1, desA1-4)RLN)
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGK GREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGT LVT VSSPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQALANKCCHVGCTKRSLAR
FCGGGSGGSGGGSWMEEVIKLCGREL VRAQIAICGMSTWS

[0288] SEQ ID NO:38 – Аналог RLN2 №15 (C22-(G4Q)₅-B10ARLN)
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGK KREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGT LVT VSSGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQGGGGQDSWMEEVIKLCGREL VRAQIAIC
GMSTWSSGGGGSGGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

[0289] SEQ ID NO:39 – Аналог RLN2 №16 (C22-(PGPA)₈-B10ARLN)
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGK KREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGT LVT VSSPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPAPGPADSWMEEVIKLCGREL VRA
QIAICGMSTWSSGGGGSGGGGQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC

[0290] SEQ ID NO:40 – рецептор RXFP1 человека
MTSGSVFFYILIFGKYFSHG GGDVKCSLGYFPCGNITKCLPQLLHCNGVDDCGNQADE
DNC GDNNGWSLQFDKYFASYKMTS QYPFEAETPECLVGSVPVQCLCQGLELDCDET N
LRAVPSVSSNVTAMSLQWN LIRKLPPDCFKNYHDLQKLYLQNNKITSISIIYAFRGLNSLT
KLYLSHNRITFLKPGVFEDLHRLEWLIIEDNHL SRISPPTFYGLNSLILLVLMNNVLTRLPD
KPLCQHMPRLHWLDLEGNHIHNLRLNLT FISC SNLTVLVMRKNKINHLNENTFAPLQKLD
ELDLGSNKIENLPPLIFKDLKELS QLNLSYNPIQKIQANQFDYLVKLKSL SLEGIEISNIQQ
RMFRPLMNLSHIYFKKFQYCGYAPHVR SCKPNTDGISSLENLLASIIQRVFWVVS AVTC
FGNIFVICMRPYIRSENKLYAMSIISLCCADCLMGIYLFVIGGF DLKFRGEYNKHAQLWM
ESTHCQLVGLSAILSTEVS VLLL TFLTLEKYICIVYPFR CVRPGKCR TITVLILIWITGFIVA
FIPLSNKEFFKNYYGTNGVC FPLHSEDTESIGA QIYSVAIFLG INLA AFIIIVFSYGSMFY SV
HQS AITATEIRNQVKKEMILAKRFFFIVFTDALCWIPIFVVKFLS LLQVEIPGTITSWVVIFI
LPINSALNPILYTLTTRPFKEMIHRFWYNYRQRKSMD SKGQKTYAPSFIWVEMWPLQEM
PPELMKPD LFTYPCEMSLISQSTR LNSYS

[0291] SEQ ID NO:41 – рецептор RXFP2 человека

MIVFLVFKHLFSRLITMFFLLHFIVLINVKDFALTQGS MITPSCQKGYFPCGNLTKCLPR
AFHCDGKDDCGNGADEENCGDTSGWATIFGTVHGNANSVALTQECFLKQYPQCCDCK
ETEECVNGDLKSVP MISNNVTLLSLKKNKIHS L PDKVFIKYTKLKKIFLQHNCIRHISRK
AFFGLCNLQILYLNHNCITTLRPGIFKDLHQLTWLILDDNPITRISQRLFTGLNSLFFLSMV
NNYLEALPKQMCAQMPQLNWVDLEGNRIKYL TNSTFLSCDSLTVLFLPRNQIGFVPEKT
FSSLKNLGELDLSSNTITELSPHLFKDLKLLQKLNLSNPLMYLHKNQFESLKQLQSLDLE
RIEIPNINTRMFQPMKNLSHIYFKNFRYCSYAPHVRICMPLTDGISSFEDLLANNILRIFVW
VIAFITCFGNLFVIGMRSFIKAENTTHAMSIKILCCADCLMGVYLFFVGIFDIKYRGQYQK
YALLWMESVQCRLMGFLAMLSTEVS VLLLTYLTLEKFLVIVFPFSNIRPGKRQTSVILICI
WMAGFLIAVIPFWNKDYFGNFYGKNGVCFLYYDQTEDIGSKGYSLGIFLGVNLLAFLII
VFSYITMFCSIQKTALQTTEVRNCFGREVAVANRFFFIVFSDAICWIPVFVVKILSLFRVEI
PDTMTSWIVIFFLPVNSALNPILYTLTTNFFKDKLKQLLHKHQRKSIFKIKKSLSTSIVWI
EDSSSLKLGVLNKITLGDSIMKPVS

[0292] SEQ ID NO:42 – рецептор RXFP3 человека

MQMADAATIAMNKAAGGDKLAELFSLVPDLLEAANTSGNASLQLPDLWWELGLELP
DGAPPGHPPGSGGAESADTEARVRILISVVYWVVCALGLAGNLLVLYLMKSMQGWKR
SSINLFVTNLALTD FQFVLTLPFWAVENALDFKWPF GKAMCKIVSMVTSMNMYASVFF
LTAMSVTRYH SVASALKSHRTRGHGRGDCCGRSLGDSCCFSAKALCVWIWALAALASL
PSAIFSTTVKVMGEELCLVRFPDKLLGRDRQFWLGLYHSQKVLLGFVLPLGIILCYLLLV
RFIADRRAAGTKGGA AVAGGRPTGASARRLSKVTKSVTIVVLSFFLCWLPNQALTTWSI
LIKFN AVPFSQEYFLCQVYAFPVS VCLAHSNSCLNPVLYCLVRREFRKALKSLLWRIASP
SITSMRPFTATTKPEHEDQGLQAPAPPHAAAEPDLLYPPGVVVYSGGRYDLLPSSSAY

[0293] SEQ ID NO:43 – рецептор RXFP4 человека

MPTLNTSASPPTFFWANASGGSVLSADDAPMPVKFLALRLMVALAYGLVGAIGLLGNL
AVLWVLSNCARRAPGPSDTFVFNALADLGLALTLPFWAAESALDFHWPFGGALCKM
VLTATVLNVYASIFLITALSVARYWVVAMAAGPGTHLSLFWARIATLAVWAAAALVTV
PTAVFGVEGEVCGVRLCLLRFPSRYWLGAYQLQRVVLA FMVPLGVITTSYLLLLAFLQR
RQRRRQDSRVVARSVRILVASFFLCWFPNHVVTLWGVLVKFDLVPWNSTFYTIQTYVFP
VTTCLAHSNSCLNPVLYCLLRREPRQALAGTFRDLRLRLWPQGGGWVQQVALKQVGR
RWVASNPRESRPSTLLTNLDRGTPG

[0294] SEQ ID NO:44 – сигнальный пептид

METDTLLLWVLLLWVPGSTG

[0295] SEQ ID NO:45 – фрагмент VHH №5 (MC6.1)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTVSSTAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGSVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAVRPGRPLITSRDANLYDYWG
QGTLVTVSS

[0296] SEQ ID NO:46 – фрагмент VHH №6 (MC6.1C6)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDSTAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSRVANLYPYWG
QGTLVTVSS

[0297] SEQ ID NO:47 – фрагмент VHH №7 (C22-G26Y)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASYRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSS

[0298] SEQ ID NO:48 – фрагмент VHH №8 (C22-R27A)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGAYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSS

[0299] SEQ ID NO:49 – фрагмент VHH №9 (C22-I57E)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDET
YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYW
GQGTLVTVSS

[0300] SEQ ID NO:50 – фрагмент VHH №10 (C22-I57Q)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDQT
YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYW
GQGTLVTVSS

[0301] SEQ ID NO:51 – фрагмент VHH №11 (C22-Y59A)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITA
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSS

[0302] SEQ ID NO:52 – фрагмент VHH №12 (C22-Y59E)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITE
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSS

[0303] SEQ ID NO:53 – фрагмент VHH №13 (C22-Y59Q)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITQ
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSS

[0304] SEQ ID NO:54 – фрагмент VHH №14 (C22-Y59S)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITS
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSS

[0305] SEQ ID NO:55 – фрагмент VHH №15 (C22-Y59T)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITT
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSS

[0306] SEQ ID NO:56 – фрагмент VHH №16 (C22-R102K)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGKPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSS

[0307] SEQ ID NO:57 – фрагмент VHH №17 (C22-R102Q)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGQPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSS

[0308] SEQ ID NO:58 – фрагмент VHH №18 (C22-R102S)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGSPLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSS

[0309] SEQ ID NO:59 – фрагмент VHH №19 (C22-P103E)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRELITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSS

[0310] SEQ ID NO:60 – фрагмент VHH №20 (C22-P103Q)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSS

[0311] SEQ ID NO:61 – фрагмент VHH №21 (C22-P103S)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRSLITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSS

[0312] SEQ ID NO:62 – фрагмент VHH №22 (C22-L104E)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPEITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSS

[0313] SEQ ID NO:63 – фрагмент VHH №23 (C22-L104G)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPGITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSS

[0314] SEQ ID NO:64 – фрагмент VHH №24 (C22-L104Q)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPQITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSS

[0315] SEQ ID NO:65 – фрагмент VHH №25 (C22-L104T)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPTITSKVADLYPYWG
QGTLVTVSS

[0316] SEQ ID NO:66 – фрагмент VHH №26 (C22-S107E)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITEKVADLYPYWG
QGTLVTVSS

[0317] SEQ ID NO:67 – L₂ №3

SGGGGSGGGG

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, содержащее структуру:

VHH-L₁-A-L₂-B,

VHH-L₁-B-L₂-A,

A-L₂-B-L₁-VHH или

B-L₂-A-L₁-VHH,

где VHH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 10, 11, 12 и 13, или последовательности, имеющей сходство с ними, по меньшей мере, на 90%,

где А представляет собой А-цепь релаксина, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO:2, 5 и 8, или последовательности, имеющей сходство с ними, по меньшей мере, на 90%,

где В представляет собой В-цепь релаксина, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO:3, 6 и 9, или последовательности, имеющей сходство с ними, по меньшей мере, на 90%,

где L₁ представляет собой первый линкер, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (GGGGQ)_n (SEQ ID NO:14), (PGPQ)_n (SEQ ID NO:17) и (PGPA)_n (SEQ ID NO:18), и где n может составлять от 1 до 10, и

где L₂ представляет собой второй линкер, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO:22, 23 и 67; или

ее фармацевтически приемлемую соль.

2. Соединение по п. 1, отличающееся тем, что А представляет собой последовательность SEQ ID NO:2.

3. Соединение по п. 1 или п. 2, отличающееся тем, что В представляет собой последовательность SEQ ID NO:3.

4. Соединение по п. 1, отличающееся тем, что А представляет собой последовательность SEQ ID NO:5.

5. Соединение по п. 1 или п. 2, отличающееся тем, что В представляет собой последовательность SEQ ID NO:6.
6. Соединение по п. 1, отличающееся тем, что А представляет собой последовательность SEQ ID NO:5, в которой отсутствуют первые четыре аминокислоты (desA1-4).
7. Соединение по п. 1, отличающееся тем, что В представляет собой последовательность SEQ ID NO:6, в которой отсутствует первая аминокислота (desB1).
8. Соединение по п. 1, отличающееся тем, что А представляет собой последовательность SEQ ID NO:5, в которой отсутствуют первые четыре аминокислоты (desA1-4), и при этом В представляет собой последовательность SEQ ID NO:6, в которой отсутствует первая аминокислота (desB1).
9. Соединение по п. 1, отличающееся тем, что А представляет собой последовательность SEQ ID NO:8.
10. Соединение по п. 1 или п. 2, отличающееся тем, что В представляет собой последовательность SEQ ID NO:9.
11. Соединение по любому из пп. 1-10, отличающееся тем, что L₁ представляет собой последовательность SEQ ID NO:19.
12. Соединение по любому из пп. 1-10, отличающееся тем, что L₁ представляет собой последовательность SEQ ID NO:20.
13. Соединение по любому из пп. 1-10, отличающееся тем, что L₁ представляет собой последовательность SEQ ID NO:21.
14. Соединение, содержащее аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO:24-39, или последовательности, имеющей сходство с ними, по меньшей мере, на 90%, или его фармацевтически приемлемая соль.

15. Соединение, состоящее в основном из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO:24-39, или последовательности, имеющей сходство с ними, по меньшей мере, на 90%, или его фармацевтически приемлемая соль.

16. Соединение, состоящее из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO:24-39, или последовательности, имеющей сходство с ними, по меньшей мере, на 90%, или его фармацевтически приемлемая соль.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая:
соединение по любому из пп. 1-16 или его фармацевтически приемлемую соль; и
фармацевтически приемлемый буфер.

18. Способ лечения патологических состояний, заболеваний и/или нарушений сердца, легких и/или почек у индивидуума, включающий этап:

введение индивидууму эффективного количества соединения по любому из пп. 1-16 или фармацевтической композиции по п. 17.

19. Соединение по любому из пп. 1-16 для применения в терапии.

20. Соединение по любому из пп. 1-16 для применения при лечении патологических состояний, заболеваний и/или нарушений сердца, легких и/или почек.

21. Применение соединения по любому из пп. 1-16 для производства лекарственного средства для лечения патологических состояний, заболеваний и/или нарушений сердца, легких и/или почек.

22. Соединение, содержащее аминокислотную последовательность EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO:10) или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% сходства с ней.

23. Соединение, содержащее аминокислотную последовательность EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG QGTLVTVSSPP (SEQ ID NO:11) или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% сходства с ней.

24. Соединение, содержащее аминокислотную последовательность EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKREFVAGIGGGVDITY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO:12) или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% сходства с ней.

25. Соединение, содержащее аминокислотную последовательность EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKREFVAGIGGGVDITY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG QGTLVTVSSPP (SEQ ID NO:13) или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% сходства с ней.

26. Соединение, содержащее аминокислотную последовательность EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRVSTAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGSVDITY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAVRPGRPLITSRDANLYDYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO:45) или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% сходства с ней.

27. Соединение, содержащее аминокислотную последовательность EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDSTAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSRVANLYPYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO:46) или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% сходства с ней.

28. Соединение, содержащее аминокислотную последовательность EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASYRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO:47) или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% сходства с ней.

29. Соединение, содержащее аминокислотную последовательность EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGAYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO:48) или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% сходства с ней.

30. Соединение, содержащее аминокислотную последовательность EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDET YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO:49) или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% сходства с ней.

31. Соединение, содержащее аминокислотную последовательность EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDQT YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO:50) или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% сходства с ней.

32. Соединение, содержащее аминокислотную последовательность EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITA YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO:51) или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% сходства с ней.

33. Соединение, содержащее аминокислотную последовательность EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITE YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO:52) или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% сходства с ней.

34. Соединение, содержащее аминокислотную последовательность EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITQ YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG

QGTLLTVSS (SEQ ID NO:53) или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% сходства с ней.

35. Соединение, содержащее аминокислотную последовательность EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITS YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG QGTLLTVSS (SEQ ID NO:54) или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% сходства с ней.

36. Соединение, содержащее аминокислотную последовательность EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITT YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITSKVADLYPYWG QGTLLTVSS (SEQ ID NO:55) или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% сходства с ней.

37. Соединение, содержащее аминокислотную последовательность EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGKPLITSKVADLYPYWG QGTLLTVSS (SEQ ID NO:56) или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% сходства с ней.

38. Соединение, содержащее аминокислотную последовательность EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGQPLITSKVADLYPYWG QGTLLTVSS (SEQ ID NO:57) или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% сходства с ней.

39. Соединение, содержащее аминокислотную последовательность EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGSPLITSKVADLYPYWG QGTLLTVSS (SEQ ID NO:58) или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% сходства с ней.

40. Соединение, содержащее аминокислотную последовательность EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY

YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRELITSKVADLYPYWG
QGT LVT VSS (SEQ ID NO:59) или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% сходства с ней.

41. Соединение, содержащее аминокислотную последовательность
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRLITSKVADLYPYWG
QGT LVT VSS (SEQ ID NO:60) или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% сходства с ней.

42. Соединение, содержащее аминокислотную последовательность
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRSLITSKVADLYPYWG
QGT LVT VSS (SEQ ID NO:61) или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% сходства с ней.

43. Соединение, содержащее аминокислотную последовательность
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPEITSKVADLYPYWG
QGT LVT VSS (SEQ ID NO:62) или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% сходства с ней.

44. Соединение, содержащее аминокислотную последовательность
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPGITSKVADLYPYWG
QGT LVT VSS (SEQ ID NO:63) или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% сходства с ней.

45. Соединение, содержащее аминокислотную последовательность
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPQITSKVADLYPYWG
QGT LVT VSS (SEQ ID NO:64) или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% сходства с ней.

46. Соединение, содержащее аминокислотную последовательность EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPTITSKVADLYPYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO:65) или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% сходства с ней.

47. Соединение, содержащее аминокислотную последовательность EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRYIDETAVAWFRQAPGKEREFVAGIGGGVDITY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPGRPLITEKVADLYPYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO:66) или последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% сходства с ней.