

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290778 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.11

(51) Int. Cl. C07K 14/575 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.09.03

(54) КОНЬЮГИРОВАННЫЕ МИМЕТИКИ ГЕПСИДИНА

(31) 62/895,201; 62/983,515; 63/020,945;
63/059,747

(72) Изобретатель:

Лю Дэвид Й. (US), Борн Грегори
Томас (AU), Таранатх Рупа, Гупта
Сунил Кумар, Модни Нишит Бачулал
(US)

(32) 2019.09.03; 2020.02.28; 2020.05.06;
2020.07.31

(33) US

(86) PCT/US2020/049244

(74) Представитель:

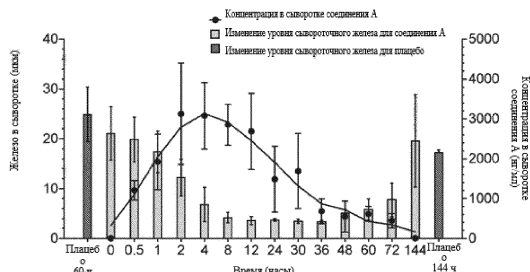
Носырева Е.Л. (RU)

(87) WO 2021/046246 2021.03.11

(71) Заявитель:

ПРОТАГОНИСТ ТЕРЕПЬЮТИКС,
ИНК. (US)

(57) В изобретении предложены аналоги гепсидина и соответствующие фармацевтические композиции, а также их применение для лечения истинной полицитемии.



A1

202290778

202290778

A1

КОНЬЮГИРОВАННЫЕ МИМЕТИКИ ГЕПСИДИНА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 62/895,201, поданной 3 сентября 2019 г., предварительной заявке США № 62/983,515, поданной 28 февраля 2020 г., предварительной заявке США № 63/020,945, поданной 6 мая 2020 г. и предварительной заявке США № 63/059,747, поданной 31 июля 2020 г., все из которых включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Рассматриваемая заявка содержит перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и, тем самым, включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 1 сентября 2020 г., называется PRTH_037_05WO_ST25.txt и имеет размер 25 КБ.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0003] Настоящее изобретение относится, помимо прочего, к определенным пептидным аналогам гепсидина, включающим в себя как пептидные мономеры, так и пептидные димеры, а также их конъюгаты и производные, и к применению пептидных аналогов для лечения и/или профилактики истинной полицитемии (PV).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Гепсидин (также называемый LEAP-1), пептидный гормон, вырабатываемый печенью, представляет собой регулятор гомеостаза железа у человека и других млекопитающих. Гепсидин действует путем связывания со своим рецептором, экспортирующим железо каналом — ферропортином, вызывая его интернализацию и деградацию. Человеческий гепсидин представляет собой 25-аминокислотный пептид (Hep25). См. Krause et al. (2000) FEBS Lett 480:147-150 и Park et al. (2001) J Biol Chem 276:7806-7810. Структура биологически активной формы 25-аминокислотного гепсидина представляет собой простую шпильку с 8 цистеинами, которые образуют 4

дисульфидные связи, как описано Jordan et al. J Biol Chem 284:24155-67. N-концевой участок необходим для функции регуляции железа, а делеция 5 N-концевых аминокислотных остатков приводит к потере функции регуляции железа. См. Nemeth et al. (2006) Blood 107:328-33.

[0005] Аномальная активность гепсидина ассоциирована с заболеваниями, связанными с перегрузкой железом, в том числе наследственным гемохроматозом (НН) и анемиями с перегрузкой железом. Наследственный гемохроматоз представляет собой генетическое заболевание, связанное с перегрузкой железом, которое в основном вызвано дефицитом гепсидина или, в некоторых случаях, резистентностью к гепсидину. Это способствует чрезмерному поглощению железа из пищи и развитию перегрузки железом. Клинические проявления НН могут включать в себя заболевание печени (например, цирроз печени и гепатоцеллюлярную карциному), диабет и сердечную недостаточность. В настоящее время единственным способом лечения НН являются периодические кровопускания, что очень обременительно для пациентов. Анемии с перегрузкой железа представляют собой наследственные анемии с неэффективным эритропоэзом, такие как β -талассемия, которые сопровождаются тяжелой перегрузкой железом. Осложнения, связанные с перегрузкой железом, являются основной причиной тяжести заболевания и смертности этих пациентов. Дефицит гепсидина является основной причиной перегрузки железом у пациентов, не получавших трансфузии, и способствует перегрузке железом у пациентов, получавших трансфузии. В настоящее время способом лечения перегрузки железом у таких пациентов является хелатирование железа, которое весьма обременительно, иногда неэффективно и сопровождается частыми побочными эффектами. Гепсидин имеет ряд недостатков, которые ограничивают его применение в качестве лекарственного средства, в том числе сложный процесс синтеза, частично обусловленный агрегацией и преципитацией белка в процессе сворачивания, что, в свою очередь, приводит к высокой стоимости препаратов.

[0006] В патентах США US9,822,157 и US 10,030,061 описаны новые аналоги гепсидина и их применение для лечения заболеваний, связанных с перегрузкой железом, которые включают в себя наследственный гемохроматоз и анемии с перегрузкой железом.

[0007] В публикации заявки PCT WO15200916 описаны дополнительные новые аналоги гепсидина и их применение для лечения заболеваний, связанных с перегрузкой железом.

[0008] В публикации заявки PCT WO17117411 описаны дополнительные новые аналоги гепсидина с улучшенным периодом полувыведения *in vivo* и их применение для лечения заболеваний, связанных с перегрузкой железом.

[0009] В публикации заявки PCT WO18048944 описаны дополнительные новые аналоги гепсидина и их применение для профилактики перегрузки железом у субъекта и/или снижения уровней сывороточного железа у субъекта.

[0010] В публикации заявки PCT WO18128828 описаны дополнительные новые аналоги гепсидина и их применение для лечения расстройств, ассоциированных с гепсидином, включая в себя профилактику и лечение заболеваний, связанных с перегрузкой железом, таких как гемохроматоз, анемии с перегрузкой железом, такие как талассемия, и заболеваний, связанных с неэффективным или усиленным эритропоэзом.

[0011] В публикации заявки PCT WO17068089 описаны дополнительные новые аналоги гепсидина (ингибиторы ферропортина) и их применение для лечения талассемии и гемохроматоза.

[0012] В патенте США US9315545 описаны дополнительные новые аналоги гепсидина и их применение для лечения заболеваний обмена железа, бета-талассемии, гемохроматоза, анемий с перегрузкой железом, алкогольной болезни печени или хронического гепатита С.

[0013] Истинная полицитемия (PV) представляет собой хроническое прогрессирующее клональное заболевание, охватывающее три линии клеток, характеризующееся повышенной пролиферацией/накоплением миелоидных, эритроидных и мегакариоцитарных клеток и определяемое Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) как миелопролиферативное новообразование (Arber et al., 2016,127(20):2391-405). Диагноз определяется двумя критериями, первый из которых представляет собой увеличение массы эритроцитов, гиперклеточность по трем линиям клеток, обнаруживаемую в биоптате костного мозга, и наличие мутаций JAK2V617F или в 12 экзоне гена JAK2, а второй критерий включает полицитемию, подтверждение

биопсией костного мозга и субнормальные уровни эритропоэтина в сыворотке (Arber et al., 2016,127(20):2391-405).

[0014] По оценкам, в США 148 000 человек живут с PV, медианный возраст которых при постановке диагноза составляет 61 год (Stein et al., J Clin Oncol. 2015 Nov 20;33(33):3953-60). Симптомы полицитемии, связанные с повышенной вязкостью крови, включают в себя усталость, боль в костях, головные боли, головокружение, нарушения зрения, атипичные боли в груди, зуд, эритромелалгию и парестезию (Tefferi et al., Blood Cancer J. 2018, 8(1):3). Клинические особенности включают в себя спленомегалию, тромботические и геморрагические осложнения, а также риск лейкоемической трансформации.

[0015] Поскольку PV является заболеванием, характеризующимся усиленным эритропоэзом, то на животных моделях было показано, что высокие дозы миметиков гепсидина могут купировать это заболевание за счет уменьшения эритропоэза (Casu et al., Blood. 2016;128(2):265-276). У мышей с PV, экспрессирующих мутацию ортологичного гена JAK2, вызывающую PV человека, введение минигепсидина значительно уменьшает спленомегалию и нормализует гематокрит. Эти исследования показывают, что минигепсидины, подобные лекарственным средствам, в будущем могут применяться в качестве терапевтических средств для лечения β -талассемии и PV у пациентов, не получавших трансфузию (Casu et al., Blood. 2016;128(2):265-276).

[0016] Очевидна потребность в новых лекарственных средствах и способах лечения и профилактики PV, в том числе PV у пациентов с высоким риском или тех, кто не переносит кровопускание. Настоящее изобретение направлено на удовлетворение этих потребностей в лечении PV.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0017] В конкретном аспекте в настоящем изобретении предложены способы лечения истинной полицитемии у нуждающегося в этом субъекта, включающие в себя введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции аналога гепсидина.

[0018] В более конкретном аспекте в настоящем изобретении предложены способы лечения истинной полицитемии у нуждающегося в этом субъекта, включающие в себя введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции,

содержащей аналог гепсидина и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель.

[0019] В одном варианте осуществления аналог гепсидина содержит пептид, содержащий формулу (I):

R1-X-Y-R2 (I) (SEQ ID NO:1)

или ее фармацевтически приемлемую соль или сольват,

где

R1 представлен водородом, C1-C6-алкилом, C6-C12-арилом, C1-C20-алканоилом или pGlu;

R2 представлен NH₂ или OH;

X представлен пептидной последовательностью, имеющей формулу II

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 (II) (SEQ ID NO:2),

где

X1 представлен Asp, Ala, Ida, pGlu, bhAsp, Leu, D-Asp или отсутствует;

X2 представлен Thr, Ala или D-Thr;

X3 представлен His, Lys или D-His;

X4 представлен Phe, Ala, Dpa или D-Phe;

X5 представлен Pro, Gly, Arg, Lys, Ala, D-Pro или bhPro;

X6 представлен Ile, Cys, Arg, Lys, D-Ile или D-Cys;

X7 представлен Cys, Ile, Leu, Val, Phe, D-Ile или D-Cys;

X8 представлен Ile, Arg, Phe, Gln, Lys, Glu, Val, Leu или D-Ile;

X9 представлен Phe или bhPhe; и

X10 представлен Lys, Phe или отсутствует;

в которой, при отсутствии Y, X7 представлен Ile; и

Y представлен пептидной последовательностью, имеющей формулу III

Y1-Y2-Y3-Y4-Y5-Y6-Y7-Y8-Y9-Y10-Y11-Y12-Y13-Y14-Y15 (III) (SEQ ID NO:3),

где

Y1 представлен Gly, Cys, Ala, Phe, Pro, Glu, Lys, D-Pro, Val, Ser или отсутствует;

Y2 представлен Pro, Ala, Cys, Gly или отсутствует;

Y3 представлен Arg, Lys, Pro, Gly, His, Ala, Trp или отсутствует;

Y4 представлен Ser, Arg, Gly, Trp, Ala, His, Tyr или отсутствует;

Y5 представлен Lys, Met, Arg, Ala или отсутствует;

Y6 представлен Gly, Ser, Lys, Ile, Ala, Pro, Val или отсутствует;

Y7 представлен Trp, Lys, Gly, Ala, Ile, Val или отсутствует;

Y8 представлен Val, Thr, Gly, Cys, Met, Tyr, Ala, Glu, Lys, Asp, Arg или отсутствует;

Y9 представлен Cys, Tyr или отсутствует;

Y10 представлен Met, Lys, Arg, Tyr или отсутствует;

Y11 представлен Arg, Met, Cys, Lys или отсутствует;

Y12 представлен Arg, Lys, Ala или отсутствует;

Y13 представлен Arg, Cys, Lys, Val или отсутствует;

Y14 представлен Arg, Lys, Pro, Cys, Thr или отсутствует; и

Y15 представлен Thr, Arg или отсутствует;

где указанный пептид формулы I, в качестве варианта, пегилирован на R1, X или Y, и где боковая цепь аминокислоты пептида, в качестве варианта, конъюгирована с липофильным заместителем или полимерным фрагментом. В сходном варианте

осуществления формула II представлена указанной выше формулой, однако X3 представлен D-Lys.

[0020] В одном варианте осуществления R1 представлен водородом, изовалериановой кислотой, изомасляной кислотой или ацетилом.

[0021] В конкретных вариантах осуществления любого из аналогов или димеров гепсидина настоящего изобретения фрагмент, увеличивающий период полувыведения, выбран из C12 (лауриновой кислоты), C14 (миристиновой кислоты), C16 (пальмитиновой кислоты), C18 (стеариновой кислоты), C20, C12 дикислоты, C14 дикислоты, C16 дикислоты, C18 дикислоты, C20 дикислоты, биотина и изовалериановой кислоты. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, увеличивающий период полувыведения, присоединен к фрагменту линкера, который присоединен к пептиду. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, увеличивающий период полувыведения, увеличивает молекулярную массу аналога гепсидина на величину от около 50 Да до около 2 кДа. В различных вариантах осуществления фрагмент, увеличивающий период полувыведения, увеличивает время полужизни в сыворотке крови, улучшает растворимость и/или повышает биодоступность аналога гепсидина.

[0022] В некоторых вариантах осуществления пептидный аналог или димер настоящего изобретения содержит фрагмент изовалериановой кислоты, конъюгированный с N-концевым остатком Asp.

[0023] В некоторых вариантах осуществления пептидный аналог настоящего изобретения содержит амидированный C-концевой остаток.

[0024] В некоторых вариантах осуществления аналог или димер гепсидина настоящего изобретения содержит последовательность Asp-Thr-His-Phe-Pro-Cys-Ile-Lys-Phe-Glu-Pro-Arg-Ser-Lys-Gly-Cys-Lys (SEQ ID NO:19) или содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 94% идентичность с этой последовательностью.

[0025] В некоторых вариантах осуществления аналог или димер гепсидина настоящего изобретения содержит последовательность Asp-Thr-His-Phe-Pro-Cys-Ile-Lys-Phe-Pro-Arg-Ser-Lys-Gly-Cys-Lys (SEQ ID NO: 19) или содержит последовательность, имеющую

по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 94% идентичность с этой последовательностью.

[0026] В сходном варианте осуществления настоящее изобретение включает в себя полинуклеотид, кодирующий пептид аналога или димера гепсидина (или мономерной субъединицы димера) настоящего изобретения.

[0027] В дополнительном сходном варианте осуществления настоящее изобретение включает в себя вектор, содержащий полинуклеотид изобретения.

[0028] В другом варианте осуществления настоящее изобретение включает в себя фармацевтическую композицию, содержащую гепсидиновый аналог, димер, полинуклеотид или вектор настоящего изобретения, и фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или плацебо.

[0029] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предложен способ связывания ферропортина или индуцирования интернализации и деградации ферропортина, включающий в себя контактирование ферропортина по меньшей мере с одним аналогом, димером или композицией гепсидина настоящего изобретения.

[0030] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предложены способы лечения истинной полицитемии.

[0031] В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение включает в себя способ лечения истинной полицитемии у нуждающегося в этом субъекта, включающий в себя введение субъекту эффективного количества аналога или фармацевтической композиции гепсидина настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления аналог или фармацевтическую композицию гепсидина вводят субъекту пероральным, внутривенным, перитонеальным, внутрикожным, подкожным, внутримышечным, интратекальным, ингаляционным, путем испарения, распыления, подъязычным, буккальным, парентеральным, ректальным, вагинальным или местным способом введения. В некоторых вариантах осуществления аналог или фармацевтическую композицию гепсидина вводят субъекту пероральным или подкожным способом. В некоторых вариантах осуществления аналог или фармацевтическую композицию гепсидина вводят субъекту не более или около двух раз в сутки, не более или около одного раза в сутки, не более или около одного раза в

двое суток, не более или около одного раза в неделю или не более или около одного раза в месяц.

[0032] В конкретных вариантах осуществления аналог гепсидина вводят субъекту в дозе от около 10 мг до около 100 мг, от около 10 мг до около 80 мг или от около 10 мг до около 50 мг. В более конкретном варианте осуществления аналог гепсидина вводят субъекту в дозе от около 20 мг до около 40 мг. В конкретных вариантах осуществления аналог гепсидина вводят субъекту в дозе или около 10 мг, около 15 мг, около 20 мг, около 25 мг, около 30 мг, около 40 мг, около 50 мг, около 60 мг, около 70 мг или около 80 мг. В конкретных вариантах осуществления аналог гепсидина вводят субъекту около одного раза в неделю. В другом конкретном варианте осуществления аналог гепсидина вводят субъекту около двух раз в неделю, например, подкожно.

[0033] В некоторых вариантах осуществления любой из раскрытых способов дополнительно включает в себя определение уровня гематокрита у субъекта в одной или более временных точках после введения аналога гепсидина и поддержание или корректировку количества вводимого субъекту аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли, причем количество увеличивают, если установленный гематокрит субъекта больше 44% или 45%, при этом количество уменьшают, если установленный гематокрит субъекта меньше 37,5% или 40%, и поддерживают количество, если установленный гематокрит субъекта составляет от 37,5% до 45%, от 37,5% до 44%, от 40% до 45% или от 40% до 44%.

[0034] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предложено устройство, включающее в себя фармацевтическую композицию настоящего изобретения, для доставки аналога или димера гепсидина изобретения субъекту, в качестве варианта перорально или подкожно.

[0035] В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение включает в себя набор, содержащий фармацевтическую композицию изобретения, упакованную с реагентом, устройство или инструкцию, или их комбинацию.

[0036] В конкретных вариантах осуществления любого из раскрытых способов, истинная полицитемия представляет собой истинную полицитемию, требующую проведения кровопусканий, или истинную полицитемию, требующую проведения кровопусканий, у пациента с низким риском.

[0037] В конкретных вариантах осуществления любого из раскрытых способов субъект представляет собой пациента с низким риском истинной полицитемии, пациента с высоким риском истинной полицитемии, пациента с симптомами истинной полицитемии, требующей проведения кровопусканий, пациента с высоким риском истинной полицитемии, требующей проведения кровопусканий, или пациента с низким риском истинной полицитемии, требующей проведения кровопусканий.

[0038] В конкретных вариантах осуществления любого из раскрытых способов субъекту поставлен диагноз истинной полицитемии и проведено по меньшей мере три кровопускания для достижения гематокрита $\leq 45\%$ в течение 24 недель до введения субъекту аналога или пептида гепсидина.

[0039] В некоторых вариантах осуществления любого из раскрытых способов субъекту вводят от около 5 мг до около 200 мг аналога или пептида гепсидина, например, от около 10 мг до около 100 мг, от около 20 мг до около 100 мг, около 20 мг, около 40 мг, около 80 мг, около 100 мг или около 120 мг.

[0040] В некоторых вариантах осуществления любого из раскрытых способов фармацевтическую композицию вводят с помощью подкожной инъекции.

[0041] В некоторых вариантах осуществления любого из раскрытых способов фармацевтическую композицию вводят приблизительно еженедельно в течение определенного периода времени.

[0042] В некоторых вариантах осуществления любого из раскрытых способов количество вводимого аналога или пептида гепсидина увеличивают в течение определенного периода времени.

[0043] В некоторых вариантах осуществления любого из раскрытых способов субъект является млекопитающим, например, человеком.

[0044] В некоторых вариантах осуществления любого из раскрытых способов применение способа приводит к снижению уровня гематокрита у субъекта до $\leq 45\%$, снижению уровня гематокрита у субъекта по меньшей мере на 3%, и/или повышению уровня сывороточного ферритина у субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъекту не требуется проведение кровопусканий в течение курса лечения, например, лечения приблизительно один раз в неделю в течение определенного периода времени.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0045] На фигурах 1A и 1B приведены данные, полученные в ходе эксперимента Cobas Iron2 Analysis для соединения A и соединения B. Фигура 1A представляет собой график, показывающий уровни сывороточного железа и концентрацию в сыворотке соединения A в указанное время после лечения соединением A. Фигура 1B представляет собой график, показывающий уровни сывороточного железа и концентрацию в сыворотке соединения B в указанное время после лечения соединением B.

[0046] На фигуре 2 показан временной профиль показателей гематокрита и числа эритроцитов у самцов обезьян *Cynomolgus* после подкожного введения плацебо (○) или соединения A в дозах 1 (●), 3 (□) и 10 (■) мг/кг/дозу один раз в неделю в течение 4 введений с 28-дневным периодом восстановления. Соединение A вызывало изменения вторичных гематологических показателей (средняя концентрация гемоглобина в эритроците, MCHC, и среднее содержание гемоглобина в эритроците, MCH), свидетельствующих об ограничении эритропоэза железом. Каждая точка представляет собой среднее значение $\pm$ СО показателей до 6 животных в основной период лечения (все группы) и до 2 животных в фазу восстановления (плацебо и 10 мг/кг соединения A). Стрелки указывают на время введения соединения A.

[0047] На фигуре 3 показано, что соединение A вызывает значительные изменения гематокрита (Hct) и вторичных гематологических показателей. Изменения Hct, среднего объема эритроцита (MCV), среднего содержания гемоглобина в эритроците (MCH), средней концентрации гемоглобина в эритроците (MCHC) оценивали после подкожного введения плацебо (○) или соединения A в дозах 0,6 (●), 2 (□) и 6 (■) мг/кг один раз в неделю в течение 13 недель подряд, после чего следовал 35-дневный период восстановления. Стрелками обозначены дни введения препарата, начиная с дня 1. Каждая точка представляет собой среднее значение $\pm$ СО показателей до 6 животных/пол в основную фазу и до 2 животных/пол в фазу восстановления.

[0048] На фигуре 4 показано, что профили билирубина соответствуют эритропоэзу, ограниченному железом, у обезьян *cynomolgus*, получающих в избытке железо. Приведены уровни общего билирубина у самцов (слева) и самок (справа) обезьян *Cynomolgus* после подкожного введения плацебо (○) или соединения A в дозах 0,6 (●),

2 (□) и 6 (■) мг/кг один раз в неделю в течение 13 недель подряд, после чего следовал 35-дневный период восстановления. Стрелками обозначены дни введения препарата, начиная с дня 1. Каждая точка представляет собой среднее значение $\pm$ СО показателей до 6 животных/пол в основную фазу и до 2 животных/пол в фазу восстановления.

[0049] На фигуре 5 показаны профили тромбоцитов у самцов (слева) и самок (справа) обезьян *Synomolgus* после подкожного введения плацебо (○) или соединения А в дозах 0,6 (●), 2 (□) и 6 (■) мг/кг один раз в неделю в течение 13 недель подряд, после чего следовал 35-дневный период восстановления. Стрелками обозначены дни введения препарата, начиная с дня 1. Каждая точка представляет собой среднее значение $\pm$ СО показателей до 6 животных/пол в основную фазу и до 2 животных/пол в фазу восстановления.

[0050] На фигуре 6 представлена схема дизайна фазы II клинического испытания.

[0051] Фигура 7 представляет собой временную диаграмму, показывающую время проведения лечебного кровопускания и лечения указанными дозами соединения А для тринадцати пациентов с PV.

[0052] Фигура 8 представляет собой график, показывающий уровни ферритина (нг/мл) у пациентов с PV, получавших соединение А в указанные временные точки. Номера субъектов соотносятся с таковыми, приведенными в таблице 9.

[0053] Фигура 9 представляет собой график, показывающий TSAT (%) у пациентов с PV, получавших соединение А в указанные временные точки. Номера субъектов соотносятся с таковыми, приведенными в таблице 9.

[0054] Фигура 10 представляет собой график, показывающий MCV (фл) у пациентов с PV, получавших соединение А в указанные временные точки. Номера субъектов соотносятся с таковыми, приведенными в таблице 9.

[0055] Фигура 11 представляет собой график, показывающий MCH (пг) у пациентов с PV, получавших соединение А в указанные временные точки. Номера субъектов соотносятся с таковыми, приведенными в таблице 9.

[0056] Фигура 12 представляет собой график, показывающий гематокрит (%) у пациентов с PV, получавших соединение А в указанные временные точки. Номера субъектов соотносятся с таковыми, приведенными в таблице 9.

[0057] Фигура 13 представляет собой график, показывающий количество эритроцитов (10^6 /мкл) у пациентов с PV, получавших соединение А в указанные временные точки. Номера субъектов соотносятся с таковыми, приведенными в таблице 9.

[0058] Фигура 14 представляет собой график, показывающий количество тромбоцитов (10^3 /мкл) у пациентов с PV до и после лечения указанными дозами соединения А в указанные временные точки. Для фигур 14-16 указанный номер субъекта соотносится с номером субъекта, приведенным в таблице 9, следующим образом: 1501-01 = 3; 1501-02 = 5; 1502-1 = 1; 1502-02 = 2; 1502-04 = 4; 1505-01 = 6; 1505-02 = 7; и 1509-01 = 8.

[0059] Фигура 15 представляет собой график, показывающий количество ретикулоцитов (%) у пациентов с PV до и после лечения указанными дозами соединения А в указанные временные точки.

[0060] Фигура 16 представляет собой график, показывающий количество лейкоцитов (/мкл) у пациентов с PV до и после лечения указанными дозами соединения А в указанные временные точки.

[0061] На фигурах 17А и 17В показаны концентрации соединения А в плазме крови пациентов с PV в различные сроки после введения указанного количества соединения А. На фигуре 17А представлены данные по отдельным временным точкам, а на фигуре 17В приведены средние значения за указанные временные интервалы.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0062] Настоящее изобретение, в целом, относится к применению пептидных аналогов гепсидина для лечения и профилактики истинной полицитемии (PV).

[0063] Гепсидин (также называемый LEAP-1), пептидный гормон, вырабатываемый печенью, представляет собой регулятор гомеостаза железа у человека и других млекопитающих. Гепсидин действует путем связывания со своим рецептором, экспортирующим железо каналом — ферропортином, вызывая его интернализацию и деградацию. Человеческий гепсидин представляет собой 25-аминокислотный пептид

(Hep25). См. Krause et al. (2000) FEBS Lett 480:147-150, и Park et al. (2001) J Biol Chem 276:7806-7810. Структура биологически активной формы 25-аминокислотного гепсидина представляет собой простую шпильку с 8 цистеинами, которые образуют 4 дисульфидные связи, как описано Jordan et al. J Biol Chem 284:24155-67. N-концевой участок необходим для функции регуляции железа, а делеция 5 N-концевых аминокислотных остатков приводит к потере функции регуляции железа. См. Nemeth et al. (2006) Blood 107:328-33.

[0064] Аномальная активность гепсидина ассоциирована с заболеваниями, связанными с перегрузкой железом, в том числе наследственным гемохроматозом (НН) и анемиями с перегрузкой железом. Наследственный гемохроматоз представляет собой генетическое заболевание, связанное с перегрузкой железом, которое в основном вызвано дефицитом гепсидина или, в некоторых случаях, резистентностью к гепсидину. Это способствует чрезмерному поглощению железа из пищи и развитию перегрузки железом. Клинические проявления НН могут включать в себя заболевание печени (например, цирроз печени и гепатоцеллюлярную карциному), диабет и сердечную недостаточность. Анемии с перегрузкой железа представляют собой наследственные анемии с неэффективным эритропоэзом, такие как β -талассемия, которые сопровождаются тяжелой перегрузкой железом.

[0065] Гепсидин имеет ряд недостатков, которые ограничивают его применение в качестве лекарственного средства, в том числе сложный процесс синтеза, частично обусловленный агрегацией и преципитацией белка в процессе сворачивания, что, в свою очередь, приводит к высокой стоимости препаратов. В настоящем изобретении предложены пептидные аналоги гепсидина, обладающие активностью гепсидина, а также другими полезными физическими свойствами, такими как улучшенная растворимость, стабильность и/или активность, что позволит производить гепсидин-подобные биологические препараты по доступной цене и применять их для лечения и профилактики истинной полицитемии.

[0066] Настоящее изобретение также, в целом, относится к пептидным аналогам гепсидина и способам их получения и применения. В некоторых вариантах осуществления аналоги гепсидина демонстрируют одну или более видов гепсидиновой активности. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к пептидным аналогам гепсидина, содержащим одну или более пептидную субъединицу,

которая образует циклизированные структуры посредством внутримолекулярной связи, например, внутримолекулярной дисульфидной связи. В конкретных вариантах осуществления циклизированная структура обладает повышенной активностью и селективностью по сравнению с нециклизованными пептидами гепсидина и их аналогами. В конкретных вариантах осуществления пептиды аналогов гепсидина настоящего изобретения демонстрируют увеличенный период полувыведения, например, при пероральном введении, по сравнению с гепсидином или предыдущими аналогами гепсидина.

Определения и терминология

[0067] Если иное не определено в настоящем документе, научные и технические термины, применяемые в настоящей заявке, имеют значения, которые обычно понимаются специалистами в данной области. В целом, применяемая терминология и способы выражения, касающиеся химии, молекулярной биологии, биологии клеток и рака, иммунологии, микробиологии, фармакологии и химии белков и нуклеиновых кислот, использованные в настоящем документе, являются общеизвестными и общепринятыми в данной области.

[0068] В контексте настоящего документа следующие термины имеют те значения, которые им приписываются, если не указано иное.

[0069] В данном описании изобретения слово «содержать» или его варианты, такие как «содержит» или «содержащий», понимается как включение указанного целого числа (или компонентов) или группы целых чисел (или компонентов), но не исключение любого другого целого числа (или компонентов) или группы целых чисел (или компонентов).

[0070] Формы единственного числа включают в себя формы множественного числа, если контекст явно не диктует иное.

[0071] Термин «включающий в себя» применяется в значении «включающий в себя, помимо прочего». «Включающий в себя» и «включающий в себя, помимо прочего» применяются взаимозаменяемо.

[0072] Термины «пациент», «субъект» и «индивидуум» могут применяться взаимозаменяемо и относятся к человеку или к животному. Эти термины включают в

себя млекопитающих, таких как люди, приматы, домашний скот (например, быки, свиньи), домашние животные (например, собаки, кошки) и грызуны (например, мыши и крысы). Термин «млекопитающее» относится к любому виду млекопитающих, таких как человек, мышь, крыса, собака, кошка, хомяк, морская свинка, кролик, домашний скот и т. п.

[0073] Термин «пептид» в контексте настоящего документа в широком смысле относится к последовательности из двух или более аминокислот, соединенных между собой пептидными связями. Следует понимать, что этот термин не обозначает конкретную длину полимера из аминокислот, а также не подразумевает и не различает, получен ли полипептид с помощью рекомбинантных методов, химического или ферментативного синтеза, или имеет природное происхождение.

[0074] Термин «пептидный аналог» в контексте настоящего документа в широком смысле относится к пептидным мономерам и пептидным димерам, имеющим один или несколько структурных отличительных признака и/или видов функциональной активности, схожих с таковыми у гепсидина или его функциональной областью. В некоторых вариантах осуществления пептидный аналог включает в себя пептиды, обладающие значительной степенью идентичности аминокислотной последовательности с гепсидином, например, пептиды, содержащие одну или несколько аминокислотных вставок, делеций или замен по сравнению с аминокислотной последовательностью гепсидина дикого типа, например, человеческого гепсидина. В некоторых вариантах осуществления пептидный аналог содержит одну или более дополнительных модификаций, таких как, например, конъюгация с другим соединением. Термин «пептидный аналог» охватывает любой пептидный мономер или пептидный димер настоящего изобретения. В некоторых случаях «пептидный аналог» может также или в качестве варианта называться в настоящем документе «аналогом гепсидина», «пептидным аналогом гепсидина» или «пептидом аналога гепсидина».

[0075] Выражения «идентичность последовательности», «процент идентичности», «процент гомологии» или, например, содержащие фразу «последовательность, на 50% идентичная», в контексте настоящего документа относятся к степени идентичности последовательностей по нуклеотидам или по аминокислотам в окне сравнения. Таким образом, «процент идентичности последовательности» можно рассчитать путем

сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, определения количества позиций, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты (например, A, T, C, G, I) или идентичный аминокислотный остаток (например, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys и Met) встречается в обеих последовательностях, чтобы получить число совпадающих позиций, деления числа совпадающих позиций на общее число позиций в окне сравнения (т. е. размер окна) и умножения результата на 100 для получения процента идентичности последовательности.

[0076] Расчеты сходства или идентичности последовательностей (в настоящем документе эти термины применяются взаимозаменяемо) могут быть выполнены следующим образом. Для определения процента идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух нуклеотидных последовательностей можно выравнивать последовательности для оптимального сравнения (например, могут быть образованы гэпы одной или обеих из первой и второй аминокислотной или нуклеотидной последовательностей для оптимального выравнивания, а негомологичные последовательности в целях сравнения могут быть проигнорированы). В некоторых вариантах осуществления длина эталонной последовательности, выровненной для сравнения, составляет по меньшей мере 30%, предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно по меньшей мере 50%, 60% и еще более предпочтительно по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 100% длины эталонной последовательности. Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих аминокислотных или нуклеотидных позициях. Если позиция в первой последовательности занята тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом, что и соответствующая позиция во второй последовательности, то молекулы идентичны в этой позиции.

[0077] Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных позиций, разделяемых последовательностями, с учетом количества гэпов и длины каждого гэпа, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей.

[0078] Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями может быть выполнено с помощью математического алгоритма. В некоторых вариантах осуществления процент идентичности между двумя

аминокислотными последовательностями определяют с помощью алгоритма Needleman и Wunsch (1970, J. Mol. Biol. 48: 444-453), который был включен в программу GAP программного пакета GCG, с применением матрицы Blossum 62 или матрицы PAM250, а также весом гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и весом длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В еще одном предпочтительном варианте осуществления процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями определяют с помощью программы GAP программного пакета GCG с применением матрицы NWSgapdna.CMP, а также весом гэпа 40, 50, 60, 70 или 80 и весом длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Другой примерный набор параметров включает в себя весовую матрицу Blossum 62 со штрафом за гэп 12, штрафом за продолжение гэпа 4 и штрафом за сдвиг рамки гэпа 5. Процент идентичности между двумя аминокислотными или нуклеотидными последовательностями также может быть определен с помощью алгоритма E. Meyers и W. Miller (1989, Cabios, 4: 11-17), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы весов замен остатков PAM120, штрафом за удлинение гэпа 12 и штрафом за гэп 4.

[0079] Пептидные последовательности, описанные в настоящем документе, могут быть применены в качестве «искомой последовательности» для проведения поиска в общедоступных базах данных, например, для идентификации других членов семейства или родственных последовательностей. Такой поиск можно выполнить с помощью программ NBLAST и XBLAST (версия 2.0), Altschul et al. (1990, J. Mol. Biol, 215: 403-10). Поиск нуклеотидов в BLAST может быть выполнен с помощью программы NBLAST, оценка = 100, длина слова = 12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновых кислот изобретения. Поиск белков в BLAST может быть выполнен с помощью программы XBLAST, оценка = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам белков изобретения. Для получения гэпированных выравниваний с целью сравнения можно использовать Gapped BLAST, как описано в работе Altschul et al. (Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997). При использовании программ BLAST и Gapped BLAST применяют параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

[0080] В контексте настоящего документа термин «консервативная замена» означает, что одна или более аминокислот заменяются на другой, биологически схожий остаток. Примеры включают в себя замену аминокислотных остатков со схожими

характеристиками, например, малых аминокислот, кислых аминокислот, полярных аминокислот, основных аминокислот, гидрофобных аминокислот и ароматических аминокислот. См., например, таблицы ниже. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или более остатков Met заменены норлейцином (Nle), который является биоизостером Met, но который, в отличие от Met, с трудом окисляется. В некоторых вариантах осуществления один или более остатков Tgr заменены Phe, или один или более остатков Phe заменены Tgr, при этом в некоторых других вариантах осуществления один или более остатков Pro заменены Npc, или один или более остатков Npc заменены Pro. Другим примером консервативной замены на остаток, обычно не встречающийся в эндогенных пептидах и белках млекопитающих, является консервативная замена Arg или Lys на, например, орнитин, канаванин, аминоэтилцистеин или другую основную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления другая консервативная замена представляет собой замену одного или более остатков Pro на bhPro, Leu или D-Npc (изонипекотиновая кислота). Более подробную информацию о фенотипически молчащих заменах в пептидах и белках см., например, Bowie et. al. Science 247, 1306-1310, 1990. В приведенной ниже схеме консервативные замены аминокислот разделены на группы по физико-химическим свойствам. I: нейтральные, гидрофильные, II: кислоты и амиды, III: основные, IV: гидрофобные, V: ароматические, объемные аминокислоты.

I	II	III	IV	V
A	N	H	M	F
S	D	R	L	Y
T	E	K	I	W
P	Q		V	
G			C	

[0081] В приведенной ниже схеме консервативные замены аминокислот разделены на группы по физико-химическим свойствам. VI: нейтральные или гидрофобные, VII: кислые, VIII: основные, IX: полярные, X: ароматические.

VI	VII	VIII	IX	X
A	E	H	M	F
L	D	R	S	Y
I		K	T	W
P			C	
G			N	
V			Q	

[0082] В контексте настоящего документа термин «аминокислота» или «любая аминокислота» относится к любым и всем аминокислотам, в том числе аминокислотам природного происхождения (например, α-аминокислоты), неестественным аминокислотам, модифицированным аминокислотам и искусственным аминокислотам. К ним относятся как D-, так и L-аминокислоты. К природным относятся аминокислоты, встречающиеся в природе, такие, например, как 23 аминокислоты, связывающиеся в пептидные цепи, образуя строительные блоки для разнообразных белков. В основном это L-стереоизомеры, хотя некоторые D-аминокислоты встречаются в оболочках бактерий и некоторых антибиотиках. Выше в таблицах перечислены 20 «стандартных» природных аминокислот. «Нестандартными» природными аминокислотами являются пирролизин (обнаружен в метаногенных организмах и других эукариотах), селеноцистеин (присутствует во многих прокариотах, а также в большинстве эукариотов) и N-формилметионин (кодируется иницирующим кодоном AUG в бактериях, митохондриях и хлоропластах). «Неестественные» или «искусственные» аминокислоты представляют собой непротеиногенные аминокислоты (т.е. не закодированные в генетическом коде), которые либо встречаются в природе, либо синтезируются химическим путем. Известно более 140 природных аминокислот, и возможны тысячи других комбинаций. Примеры «неестественных» аминокислот включают в себя β-аминокислоты (β^3 и β^2), гомоаминокислоты, производные пролина и пировиноградной кислоты, 3-замещенные производные аланина, производные глицина, кольцевые производные фенилаланина и тирозина, линейные основные аминокислоты, диаминокислоты, D-аминокислоты и N-метиламинокислоты. Неестественные или искусственные аминокислоты также включают в себя модифицированные аминокислоты. «Модифицированные» аминокислоты включают в себя аминокислоты (например, природные аминокислоты), которые подверглись химической модификации

для включения в себя группы, групп или химического фрагмента, который в естественных условиях не присутствует в аминокислоте.

[0083] Как понятно специалисту, пептидные последовательности, раскрытые в настоящем документе, показаны слева направо, причем левый конец последовательности является N-концом пептида, а правый конец последовательности — С-концом пептида. Среди последовательностей, раскрытых в настоящем документе, есть последовательности, содержащие фрагмент «Н_у-» на аминоконце (N-конце) последовательности и фрагмент «-ОН» или фрагмент «-NH₂» на карбоксиконце (С-конце) последовательности. В таких случаях, и если не указано иное, фрагмент «Н_у-» на N-конце рассматриваемой последовательности указывает на атом водорода, соответствующий присутствию свободной первичной или вторичной аминогруппы на N-конце, а фрагмент «-ОН» или «-NH₂» на С-конце последовательности указывает на гидроксигруппу или аминогруппу, соответствующую присутствию амидной (CONH₂) группы на С-конце, соответственно. В каждой последовательности изобретения С-концевой фрагмент «-ОН» может быть заменен на С-концевой фрагмент «-NH₂», и наоборот. Далее подразумевается, что фрагмент на аминоконце или карбоксиконце может представлять собой связь, например, ковалентную связь, особенно в ситуациях, когда аминоконец или карбоксиконец связаны с линкером или с другим химическим фрагментом, например, фрагментом ПЭГ.

[0084] Термин «NH₂» в контексте настоящего документа относится к свободной аминогруппе, присутствующей на аминоконце полипептида. Термин «ОН» в контексте настоящего документа относится к свободной карбоксигруппе, присутствующей на карбоксиконце пептида. Кроме того, термин «Ас» в контексте настоящего документа относится к ацетильной защите путем ацилирования С- или N-конца полипептида.

[0085] Термин «карбокси» в контексте настоящего документа относится к -CO₂H.

[0086] В основном названия природных и искусственных аминокислотных остатков, используемые в настоящем документе, соответствуют соглашениям о наименовании, предложенным Комиссией IUPAC по номенклатуре органических соединений и Комиссией IUPAC-IUB по биохимической номенклатуре, изложенным в «Номенклатуре α-аминокислот (рекомендации, 1974)», Biochemistry, 14(2), (1975). Если

названия и сокращения аминокислот и аминокислотных остатков, используемые в данном описании изобретения и прилагаемой формуле изобретения, отличаются от предложенных, то они будут понятны читателю. Некоторые сокращения, используемые в описании изобретения, раскрыты в приведенной ниже таблице 1.

Таблица 1. Сокращения искусственных аминокислот и химических фрагментов

Сокращение	Определение
DIG	Дигликолевая кислота
Dapa	Диаминопропионовая кислота
Daba	Диаминомасляная кислота
Pen	Пеницилламин
Sarc или Sar	Саркозин
Cit	Цитролин
Cav	Каванин
NMe-Arg	N-метиларгинин
NMe-Trp	N-метилтриптофан
NMe-Phe	N-метилфенилаланин
Ac-	Ацетил
2-Nal	2-нафтилаланин
1-Nal	1-нафтилаланин
Bip	Дифенилаланин
β Ala	бета-аланин
Aib	2-аминомасляная кислота
Azt	<i>азетидин-2-карбоновая кислота</i>
Tic	(3S)-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновая кислота
Phe(OMe)	Тирозин (4-метил)

Сокращение	Определение
N-MeLys	N-метиллизин
N-MeLys(Ac)	N-ε-ацетил-D-лизин
Dpa	β,β дифенилаланин
NH ₂	Свободный амин
CONH ₂	Амид
COOH	Кислота
Phe(4-F)	4-фторфенилаланин
PEG3	NH ₂ CH ₂ CH ₂ (OCH ₂ CH ₂) ₃ CH ₂ CH ₂ CO ₂ H
m-PEG3	CH ₃ OCH ₂ CH ₂ (OCH ₂ CH ₂) ₂ CH ₂ CH ₂ CO ₂ H
m-PEG4	CH ₃ OCH ₂ CH ₂ (OCH ₂ CH ₂) ₃ CH ₂ CH ₂ CO ₂ H
m-PEG8	CH ₃ OCH ₂ CH ₂ (OCH ₂ CH ₂) ₇ CH ₂ CH ₂ CO ₂ H
PEG11	O-(2-аминоэтил)-O'-(2-карбоксиэтил)- ундекаэтиленгликоль NH ₂ CH ₂ CH ₂ (OCH ₂ CH ₂) ₁₁ CH ₂ CH ₂ CO ₂ H
PEG13	Бифункциональный ПЭГ-линкер с 13 молекулами полиэтиленгликоля
PEG25	Бифункциональный ПЭГ-линкер с 25 молекулами полиэтиленгликоля
PEG1K	Бифункциональный ПЭГ-линкер с полиэтиленгликолем мол. м. 1000 Да
PEG2K	Бифункциональный ПЭГ-линкер с полиэтиленгликолем мол. м. 2000 Да
PEG3.4K	Бифункциональный ПЭГ-линкер с полиэтиленгликолем мол. м. 3400 Да
PEG5K	Бифункциональный ПЭГ-линкер с полиэтиленгликолем мол. м. 5000 Да
IDA или Ida	Иминодиуксусная кислота

Сокращение	Определение
IDA-Palm	(Пальмитил)-иминодиуксусная кислота
hPhe	Гомофенилаланин
Ahx	Аминогексановая кислота
DIG-OH	Гликолевая одноосновная кислота
Триазин	Аминопропилтриазиновая двухосновная кислота
Бок-триазин	Бок-триазиновая двухосновная кислота
Трифтормасляная кислота	4,4,4-Трифтормасляная кислота
2-метилтрифтормасляная кислота	2-метил-4,4,4-масляная кислота
Трифторпентановая кислота	5,5,5-трифторпентановая кислота
1,4-фенилендиуксусная кислота	<i>пара</i> -фенилендиуксусная кислота
1,3-фенилендиуксусная кислота	<i>мета</i> -фенилендиуксусная кислота
DTT	Дитиотреитол
Nle	Норлейцин
β hTrp или bhTrp	β -гомотриптофан
β hPhe или bhPhe	β -гомофенилаланин
Phe(4-CF ₃)	4-трифторметилфенилаланин
β Glu или bGlu	β -глутаминовая кислота
β hGlu или bhGlu	β -гомोगлутаминовая кислота
2-2-индан	2-аминоиндан-2-карбоновая кислота
1-1-индан	1-аминоиндан-1-карбоновая кислота
hCha	Гомоциклогексаланин
Циклобутил	Циклобутилаланин

Сокращение	Определение
hLeu	Гомолейцин
Gla	γ-карбоксиглутаминовая кислота
Aep	3-(2-аминоэтокси)пропионовая кислота
Aea	(2-аминоэтокси)уксусная кислота
IsoGlu-октановая кислота	Октаноил-γ-Glu
K-октановая кислота	Октаноил-ε-Lys
Dapa(Palm)	Гексадеканоил-β-диаминопропионовая кислота
IsoGlu-Palm	Гексадеканоил-γ-Glu
C-StBu	S-трет-бутилтиоцистеин
C-tBu	S-трет-бутилцистеин
Dapa(AcBr)	NY-(бромацетил)-2,3-диаминопропионовая кислота
Tle	<i>Трет</i> -лейцин
Phg	Фенилглицин
Oic	октагидроиндол-2-карбоновая кислота
Chg	α-циклогексилглицин
GP-(Hyp)	Gly-Pro-гидроксиPro
Inp	Изонипекотиновая кислота
Amc	4-(аминометил)циклогексанкарбоновая кислота
Бетаин	$(\text{CH}_3)_3\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
D-Npc	Изонипекотиновая кислота
Npc	Нипекотиновая кислота

[0087] Если в настоящем описании изобретения аминокислоты природного происхождения не упоминаются под полным названием (например, аланин, аргинин и т. д.), то они обозначены традиционными трехбуквенными или однобуквенными сокращениями (например, Ala или A для аланина, Arg или R для аргинина и т. д.). В

случае менее распространенных или искусственных аминокислот, если они не упоминаются под полным названием (например, саркозин, орнитин и т. д.), то их остатки обозначены часто используемыми трех- или четырехзначными кодами, в том числе Sar или Sarc (саркозин, т. е. N-метилглицин), Aib (α -аминоизомасляная кислота), Daba (2,4-диаминомасляная кислота), Dapa (2,3-диаминопропановая кислота), γ -Glu (γ -глутаминовая кислота), pGlu (пироглутаминовая кислота), Gaba (γ -аминомасляная кислота), β -Pro (пирролидин-3-карбоновая кислота), 8Ado (8-амино-3,6-диоксооктановая кислота), Abu (4-аминомасляная кислота), bhPro (β -гомопролин), bhPhe (β -гомо-L-фенилаланин), bhAsp (β -гомоаспарагиновая кислота)], Dpa (β,β -дифенилаланин), Ida (иминодиуксусная кислота), hCys (гомоцистеин), bhDpa (β -гомо- β,β -дифенилаланин).

[0088] Кроме того, R¹ во всех последовательностях может быть заменен изовалериановой кислотой или ее эквивалентом. В некоторых вариантах осуществления, в которых пептид настоящего изобретения конъюгирован с кислотным соединением, таким как, например, изовалериановая кислота, изомасляная кислота, валериановая кислота и т. п., наличие такой конъюгации относится к кислотной форме. Так, например, но не ограничиваясь этим, вместо указания конъюгации изовалериановой кислоты с пептидом путем ссылки на изовалероил, в некоторых вариантах осуществления настоящей заявки такая конъюгация может быть указана как изовалериановая кислота.

[0089] В контексте настоящего документа термин «L-аминокислота» относится к «L-изомерной» форме пептида, и, наоборот, термин «D-аминокислота» относится к «D-изомерной» форме пептида. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе аминокислотные остатки имеют «L-изомерную» форму, однако остатки, имеющие «D-изомерную» форму, могут быть заменены на любой L-аминокислотный остаток при условии, что при этом в пептиде сохраняется желаемая функция.

[0090] Если не указано иное, то в документе упоминаются L-изомерные формы рассматриваемых природных и искусственных аминокислот, обладающих хиральным центром. В соответствующих случаях D-изомерная форма аминокислоты обозначается традиционным способом с помощью префикса «D» перед обычным трехбуквенным кодом (например, Dasp, (D)Asp или D-Asp; Dphe, (D)Phe или D-Phe).

[0091] В контексте настоящего документа «низший гомолог Lys» относится к аминокислоте, имеющей структуру лизина, но при этом обладающий в боковой цепи на один или более атомов углерода меньше по сравнению с лизином.

[0092] В контексте настоящего документа «высший гомолог Lys» относится к аминокислоте, имеющей структуру лизина, но при этом обладающий в боковой цепи на один или более атомов углерода больше по сравнению с лизином.

[0093] Термин «DRP» в контексте настоящего документа относится к пептидам, богатым дисульфидами.

[0094] Термин «димер» в контексте настоящего документа в широком смысле относится к пептиду, содержащему два или более мономерных субъединиц. Некоторые субъединицы содержат два DRP. Димеры настоящего изобретения включают в себя гомодимеры и гетеродимеры. Мономерная субъединица димера может быть связана своим С- или N-концом, или посредством внутренних аминокислотных остатков. Каждая мономерная субъединица димера может быть связана одинаковыми или различными участками (например, С-концом, N-концом или внутренним участком).

[0095] В контексте настоящего документа касательно некоторых пептидных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, круглые скобки, например, (), обозначают конъюгации боковых цепей, а квадратные скобки, например, [], обозначают замены неестественных аминокислот или аминокислоты и конъюгированные боковые цепи. Как правило, если линкер показан на N-конце пептидной последовательности, то это означает, что пептид димеризован с другим пептидом, причем линкер присоединен к N-концам двух пептидов. Как правило, если линкер показан на С-конце пептидной последовательности или структуры, то это означает, что пептид димеризован с другим пептидом, причем линкер присоединен к С-концам двух пептидов.

[0096] Термины «замещение изостера» и «замена изостера» в настоящем документе применяются взаимозаменяемо и относятся к любой аминокислоте или другому аналогичному фрагменту, обладающему химическими и/или структурными свойствами, схожими с таковыми конкретной аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления замещение изостера представляет собой консервативную замену на природную или искусственную аминокислоту.

[0097] Термин «циклизованный» в контексте настоящего документа относится к реакции, в которой одна часть молекулы полипептида становится связанной с другой частью молекулы полипептида с образованием замкнутого кольца, например, путем образования дисульфидного мостика или другой подобной связи.

[0098] Термин «субъединица» в контексте настоящего документа относится к одному из пары полипептидных мономеров, которые соединяются с образованием димерной пептидной композиции.

[0099] Термин «фрагмент линкера» в контексте настоящего документа в широком смысле относится к химической структуре, способной связывать или соединять две пептидные мономерные субъединицы с образованием димера.

[00100] Термин «сольват» в контексте настоящего изобретения относится к комплексу определенной стехиометрии, образованному между растворителем (например, аналогом гепсидина или его фармацевтически приемлемой солью в соответствии с изобретением) и растворителем. Так, растворителем может быть, например, вода, этанол или другое фармацевтически приемлемое, обычно низкомолекулярное органическое соединение, такое, помимо прочего, как уксусная кислота или молочная кислота. Если растворителем является вода, то такой сольват обычно называют гидратом.

[00101] Термин «фармацевтически приемлемая соль» в контексте настоящего документа означает соли или цвиттер-ионные формы пептидов или соединений настоящего изобретения, которые являются водо- или жирорастворимыми, или диспергируемыми, которые подходят для лечения заболеваний и не обладают неспецифической токсичностью и раздражением, не вызывают аллергической реакции, которые соответствуют приемлемому соотношению польза/риск, и которые эффективны при применении их по назначению. Соли могут быть получены в процессе окончательного выделения и очистки соединений или отдельно путем реакции аминокислоты с подходящей кислотой. Репрезентативные соли присоединения кислоты включают в себя ацетат, адипат, альгинат, цитрат, аспартат, бензоат, бензолсульфонат, бисульфат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, диглюконат, глицерофосфат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, формиат, фумарат, гидрохлорид, гидробромид, гидроиодид, 2-гидроксиэтансульфонат (изетионат), лактат, малеат, мезитиленсульфонат,

метансульфонат, нафтиленсульфонат, никотинат, 2-нафталинсульфонат, оксалат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, пикрат, пивалат, пропионат, сукцинат, тартрат, трихлорацетат, трифторацетат, фосфат, глутамат, бикарбонат, паратолуолсульфонат и ундеканоеат. Кроме того, аминогруппы в соединениях настоящего изобретения могут быть кватернизованы метил-, этил-, пропил- и бутилхлоридами, бромидами и йодидами; диметил-, диэтил-, дибутил- и диамилсульфатами; децил-, лаурил-, миристил- и стерилхлоридами, бромидами и йодидами; бензил- и фенэтилбромидами. Примеры кислот, которые могут быть использованы для образования терапевтически приемлемых солей присоединения, включают в себя неорганические кислоты, такие как соляная, бромная, серная и фосфорная, и органические кислоты, такие как щавелевая, малеиновая, янтарная и лимонная. Фармацевтически приемлемая соль может соответственно представлять собой соль, выбранную, например, из солей присоединения кислоты и основных солей. Примеры солей присоединения кислоты включают в себя хлоридные соли, цитратные соли и ацетатные соли. Примеры основных солей включают в себя соли, в которых катион выбран из катионов щелочных металлов, таких как ионы натрия или калия, катионов щелочноземельных металлов, таких как ионы кальция или магния, а также замещенных ионов аммония, таких как ионы типа $N(R1)(R2)(R3)(R4)^+$, где R1, R2, R3 и R4 независимо друг от друга обычно обозначают водород, необязательно замещенный C1-6-алкил или необязательно замещенный C2-6-алкенил. Примеры соответствующих C1-6-алкильных групп включают в себя метил, этил, 1-пропил и 2-пропил. Примеры соответствующих C2-6-алкенильных групп включают в себя этенил, 1-пропенил и 2-пропенил. Другие примеры фармацевтически приемлемых солей описаны в «Remington's Pharmaceutical Sciences», 17th edition, Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, USA, 1985 (и более поздних изданиях), в «Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology», 3rd edition, James Swarbrick (Ed.), Informa Healthcare USA (Inc.), NY, USA, 2007, и в J. Pharm. Sci. 66: 2 (1977). Кроме того, обзор подходящих солей см. в *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, Stahl и Wermuth (Wiley-VCH, 2002). Другие подходящие основные соли получают из оснований, которые образуют нетоксичные соли. Репрезентативные примеры включают в себя соли алюминия, аргинина, бензатина, кальция, холина, диэтиламина, диоламина, глицина, лизина, магния, меглюмина, оламина, калия, натрия, трометамина и цинка. Также могут быть образованы гемисоли кислот и оснований, например, гемисульфатные и гемикальциевые соли.

[00102] Термин «N(альфа)метилование» в контексте настоящего документа описывает метилирование альфа-аминной аминокислоты, также обычно называемое N-метилованием.

[00103] Термин «симметричное метилирование» или «Arg-Me-sym» в контексте настоящего документа описывает симметричное метилирование двух атомов азота гуанидиновой группы аргинина. Кроме того, термин «асимметричное метилирование» или «Arg-Me-asym» описывает метилирование одного атома азота гуанидиновой группы аргинина.

[00104] Термин «ацилирующие органические соединения» в контексте настоящего документа относится к различным соединениям с функциональными свойствами карбоновой кислоты, которые применяются для ацилирования N-конца аминокислотной субъединицы перед образованием C-концевого димера. Неограничивающие примеры ацилирующих органических соединений включают в себя циклопропилуксусную кислоту, 4-фторбензойную кислоту, 4-фторфенилуксусную кислоту, 3-фенилпропионовую кислоту, янтарную кислоту, глутаровую кислоту, цикlopentanкарбоновую кислоту, 3,3,3-трифторпропионовую кислоту, 3-фторметилмасляную кислоту, тетраэдро-2H-пиран-4-карбоновую кислоту.

[00105] Термин «алкил» включает в себя прямоцепочечный или разветвленный, нециклический или циклический насыщенный алифатический углеводород, содержащий от 1 до 24 атомов углерода. Репрезентативные насыщенные прямоцепочечные алкилы включают в себя, помимо прочего, метил, этил, *n*-пропил, *n*-бутил, *n*-пентил, *n*-гексил и т. п., а насыщенные разветвленные алкилы включают в себя, помимо прочего, изопропил, *втор*-бутил, изобутил, *трет*-бутил, изопентил и т. п. Репрезентативные насыщенные циклические алкилы включают в себя, помимо прочего, циклопропил, циклобутил, цикlopентил, циклогексил и т. п., а ненасыщенные циклические алкилы включают в себя, помимо прочего, цикlopентенил, циклогексенил и т. п.

[00106] В контексте настоящего документа «терапевтически эффективное количество» пептидных агонистов изобретения предполагает описание количества пептидного агониста, достаточного для лечения заболевания, связанного с гепсидином, включая в себя, помимо прочего, любое из заболеваний и расстройств, описанных в настоящем

документе (например, заболевание обмена железа). В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество позволяет достичь желаемого соотношения польза/риск, примененного к любому медицинскому лечению.

[00107] Гематокрит — это отношение объема эритроцитов к объему цельной крови. Нормальный диапазон гематокрита различается в зависимости от пола и составляет приблизительно от 45% до 52% у мужчин и от 37% до 48% у женщин. Клинической целью лечения PV является достижение гематокрита ниже 45%. В настоящем документе гематокрит также может именоваться как уровни гематокрита, и предполагается, что числовое значение уровня гематокрита, например, 45, означает гематокрит 45%.

Пептидные аналоги гепсидина

[00108] В настоящем изобретении предложены пептидные аналоги гепсидина, которые могут быть мономерами или димерами (вместе именуемые как «аналоги гепсидина»).

[00109] В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина настоящего изобретения связывает ферропортин, например, человеческий ферропортин. В некоторых вариантах осуществления аналоги гепсидина настоящего изобретения специфически связывают человеческий ферропортин. В контексте настоящего документа «специфически связывается» означает преимущественное взаимодействие специфического связывающего агента с определенным лигандом по сравнению с другими агентами в образце. Например, специфический связывающий агент, который специфически связывает определенный лиганд, связывает его в соответствующих условиях в количестве или степени, превышающих наблюдаемые при любом неспецифическом взаимодействии с другими компонентами в образце. Соответствующие условия — это условия, обеспечивающие взаимодействие между определенным специфическим связывающим агентом и определенным лигандом. Эти условия включают в себя pH, температуру, концентрацию, растворитель, время инкубации и т. п., и могут отличаться в разных парах определенных специфического связывающего агента и лиганда, но могут быть легко определены специалистами в данной области. В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина настоящего изобретения связывает ферропортин с большей специфичностью, чем эталонное соединение гепсидина (например, любое из эталонных соединений гепсидина,

представленных в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина настоящего изобретения проявляет специфичность к ферропортину, которая по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 700%, 1000% или 10 000% выше, чем у эталонного соединения гепсидина (например, любого из эталонных соединений гепсидина, представленных в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина настоящего изобретения проявляет специфичность к ферропортину, которая по меньшей мере около 5 раз или по меньшей мере около 10, 20, 50 или 100 раз выше, чем у эталонного соединения гепсидина (например, любого из эталонных соединений гепсидина, представленных в настоящем документе).

[00110] В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина настоящего изобретения проявляет гепсидиновую активность. В некоторых вариантах осуществления активность представляет собой активность *in vitro* или *in vivo*, например, активность *in vivo* или *in vitro*, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина настоящего изобретения проявляет по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или более 99% активности, проявляемой эталонным соединением гепсидина (например, любым из эталонных соединений гепсидина, представленных в настоящем документе).

[00111] В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина настоящего изобретения проявляет по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или более 99% способности связывания ферропортина, которую проявляет эталонный гепсидин. В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина настоящего изобретения имеет более низкий IC₅₀ (т. е. более высокую аффинность связывания) для связывания с ферропортином (например, человеческим ферропортином) по сравнению с эталонным гепсидином. В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина настоящего изобретения имеет IC₅₀ в анализе конкурентного связывания ферропортина, который по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 700% или 1000% ниже, чем у эталонного гепсидина.

[00112] В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина настоящего изобретения проявляет повышенную гепсидиновую активность по сравнению с эталонным пептидом гепсидина. В некоторых вариантах осуществления активность

представляет собой активность *in vitro* или *in vivo*, например, активность *in vivo* или *in vitro*, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина настоящего изобретения проявляет в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 или 200 раз большую активность гепсидина по сравнению с эталонным гепсидином. В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина настоящего изобретения проявляет по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или более 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 700% или 1000% большую активность, чем эталонный гепсидин.

[00113] В некоторых вариантах осуществления пептидный аналог настоящего изобретения проявляет по меньшей мере примерно на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или более 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 700% или 1000% большую активность *in vitro* в индуцировании деградации белка ферропортина человека по сравнению с эталонным гепсидином, причем активность измеряется в соответствии со способом, описанным в настоящем документе.

[00114] В некоторых вариантах осуществления пептид или пептидный димер настоящего изобретения проявляет по меньшей мере примерно на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или более 99%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 700% или 1000% большую активность *in vivo* в индуцировании снижения свободного железа плазмы у человека по сравнению с эталонным гепсидином, причем активность измеряется в соответствии со способом, описанным в настоящем документе.

[00115] В некоторых вариантах осуществления активность представляет собой активность *in vitro* или *in vivo*, например, активность *in vivo* или *in vitro*, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина настоящего изобретения проявляет в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 или 200 раз больше или по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 700% или 1000% большую активность, чем эталонный гепсидин, причем активность представляет собой активность *in vitro* по индуцированию деградации ферропортина, например, как измерено в соответствии с примерами, приведенными в настоящем документе; или активность представляет собой активность

in vivo по снижению свободного железа плазмы, например, как измерено в соответствии с примерами, приведенными в настоящем документе.

[00116] В некоторых вариантах осуществления аналоги гепсидина настоящего изобретения имитируют активность гепсидина Нер25, биологически активной формы 25-аминокислотного гепсидина человека, и в настоящем документе называются «минигепсидинами». В контексте настоящего документа в некоторых вариантах осуществления соединение (например, аналог гепсидина), обладающее «активностью гепсидина», означает, что соединение обладает способностью снижать концентрацию железа в плазме у субъектов (например, мышей или людей) при его введении (например, парентеральном введении или пероральном применении) дозозависимым и зависящим от времени образом. См., например, в работе Rivera et al. (2005), Blood 106:2196-9. В некоторых вариантах осуществления пептиды настоящего изобретения снижают концентрацию железа в плазме крови субъекта по меньшей мере примерно в 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз, или по меньшей мере примерно на 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или около 99%.

[00117] В некоторых вариантах осуществления аналоги гепсидина настоящего изобретения обладают активностью *in vitro*, определяемой по способности вызывать интернализацию и деградацию ферропортина в линии клеток, экспрессирующих ферропортин, как описано в работе Nemeth et al. (2006) Blood 107:328-33. В некоторых вариантах осуществления активность *in vitro* измеряют по дозозависимой потере флуоресценции клеток, созданных для отображения ферропортина, слитого с зеленым флуоресцентным белком, как в работе Nemeth et al. (2006) Blood 107:328-33. Аликвоты клеток инкубируют в течение 24 часов с постепенно изменяющимися концентрациями эталонного препарата Нер25 или минигепсидина. В соответствии с настоящим документом, значения EC_{50} представлены как концентрация определенного соединения (например, пептида аналога гепсидина или пептидного димера настоящего изобретения), которая вызывает 50% от максимальной потери флуоресценции, генерированной эталонным соединением. EC_{50} препаратов Нер25 в этом анализе составляет от 5 до 15 нмоль, и в некоторых вариантах осуществления предпочтительные аналоги гепсидина настоящего изобретения имеют значения EC_{50} в анализах активности *in vitro* около 1 000 нмоль или менее. В некоторых вариантах осуществления EC_{50} аналога гепсидина настоящего изобретения в анализе активности *in vitro* (например, как описано в работе Nemeth et al. (2006) Blood 107:328-33 или в

примере, приведенном в настоящем документе) составляет менее, чем примерно любое из значений 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 или 500 нМ. В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина или биотерапевтическая композиция (например, любая из фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе) имеет значение EC_{50} около 1 нмоль или менее.

[00118] Для расчета активности гепсидина и активности *in vitro* аналогов гепсидина в соответствии с настоящим изобретением могут быть применены другие способы, известные в данной области. Например, в некоторых вариантах осуществления активность *in vitro* аналогов гепсидина или эталонных пептидов измеряют их способностью интернализировать клеточный ферропортин, который определяют с помощью иммуногистохимии или проточной цитометрии с применением антител, распознающих внеклеточные эпитопы ферропортина. В некоторых альтернативных вариантах осуществления активность *in vitro* аналогов гепсидина или эталонных пептидов измеряют по их дозозависимой способности ингибировать отток железа из клеток, экспрессирующих ферропортин, которые предварительно были загружены радиоизотопами или стабильными изотопами железа, как в работе Nemeth et al. (2006) Blood 107:328-33.

[00119] В некоторых вариантах осуществления аналоги гепсидина настоящего изобретения проявляют повышенную стабильность (например, измеряемую периодом полувыведения, скоростью деградации белка) по сравнению с эталонным гепсидином. В некоторых вариантах осуществления стабильность аналога гепсидина настоящего изобретения повышена по меньшей мере примерно в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 или 200 раз, или по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% или 500% по сравнению с эталонным гепсидином. В некоторых вариантах осуществления стабильность представляет собой стабильность, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления стабильность представляет собой стабильность плазмы, например, в качестве варианта измеренную в соответствии со способом, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления стабильность представляет собой стабильность при пероральной доставке.

[00120] В конкретных вариантах осуществления аналог гепсидина настоящего изобретения имеет более длительный период полувыведения, чем эталонный гепсидин. В конкретных вариантах осуществления аналог гепсидина настоящего изобретения при определенном наборе условий (например, температуре, pH) имеет период полувыведения по меньшей мере около 5 минут, по меньшей мере около 10 минут, по меньшей мере около 20 минут, по меньшей мере около 30 минут, по меньшей мере около 45 минут, по меньшей мере около 1 часа, по меньшей мере около 2 часов, по меньшей мере около 3 часов, по меньшей мере около 4 часов, по меньшей мере около 5 часов, по крайней мере около 6 часов, по меньшей мере около 12 часов, по меньшей мере около 18 часов, по меньшей мере около 1 суток, по меньшей мере около 2 суток, по меньшей мере около 4 суток, по меньшей мере около 7 суток, по меньшей мере около 10 суток, по меньшей мере около двух недель, по меньшей мере около трех недель, по меньшей мере около 1 месяца, по меньшей мере около 2 месяцев, по меньшей мере около 3 месяцев или более, или любой промежуточный период полувыведения или колеблется в этих пределах, около 5 минут, около 10 минут, около 20 минут, около 30 минут, около 45 минут, около 1 часа, около 2 часов, около 3 часов, около 4 часов, около 5 часов, около 6 часов, около 12 часов, около 18 часов, около 1 суток, около 2 суток, около 4 суток, около 7 суток, около 10 суток, около двух недель, около трех недель, около 1 месяца, около 2 месяцев, около 3 месяцев или более, или любой промежуточный период полувыведения или колеблется в этих пределах. В некоторых вариантах осуществления период полувыведения аналога гепсидина настоящего изобретения увеличен за счет его конъюгации с одним или более липофильными заместителями или фрагментом, увеличивающим период полувыведения, например, любым из липофильных заместителей или фрагментов, увеличивающих период полувыведения, раскрытых в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления период полувыведения аналога гепсидина настоящего изобретения увеличен за счет его конъюгации с одним или более полимерными фрагментами, например, любым из полимерных фрагментов или фрагментов, увеличивающих период полувыведения, раскрытых в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина настоящего изобретения имеет период полувыведения, как описано выше, при определенном наборе условий, причем температура составляет около 25 °C, около 4 °C или около 37 °C, а pH представляет собой физиологический pH или pH около 7,4.

[00121] В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина настоящего изобретения, содержащий конъюгированный фрагмент, увеличивающий период полувыведения, обладает увеличенным временем полужизни в сыворотке крови после перорального, внутривенного или подкожного введения по сравнению с тем же аналогом, но не содержащим конъюгированный фрагмент, увеличивающий период полувыведения. В конкретных вариантах осуществления время полужизни аналога гепсидина настоящего изобретения в сыворотке крови после перорального, внутривенного или подкожного введения составляет по меньшей мере 12 часов, по меньшей мере 24 часа, по меньшей мере 30 часов, по меньшей мере 36 часов, по меньшей мере 48 часов, по меньшей мере 72 часа или по меньшей мере 168 часов. В конкретных вариантах осуществления он составляет от 12 до 168 часов, от 24 до 168 часов, от 36 до 168 часов или от 48 до 168 часов.

[00122] В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина настоящего изобретения, содержащий конъюгированный фрагмент, увеличивающий период полувыведения, приводит к снижению концентрации сывороточного железа после перорального, внутривенного или подкожного введения субъекту. В конкретных вариантах осуществления концентрация железа в сыворотке крови субъекта снижается до менее чем 10%, менее чем 20%, менее чем 25%, менее чем 30%, менее чем 40%, менее чем 50%, менее чем 60%, менее чем 70%, менее чем 80% или менее чем 90% от концентрации железа в сыворотке крови в отсутствие введения субъекту аналога гепсидина. В конкретных вариантах осуществления снижение концентрации железа в сыворотке крови сохраняется в течение по меньшей мере 1 часа, по меньшей мере 4 часов, по меньшей мере 10 часов, по меньшей мере 12 часов, по меньшей мере 24 часов, по меньшей мере 36 часов, по меньшей мере 48 часов или по меньшей мере 72 часов после введения субъекту. В конкретных вариантах осуществления оно сохраняется от 12 до 168 часов, от 24 до 168 часов, от 36 до 168 часов или от 48 до 168 часов. В одном варианте осуществления концентрация железа в сыворотке крови субъекта снижается до менее чем 20% спустя около 4 часов или около 10 часов после введения субъекту, например, внутривенно, перорально или подкожно. В одном варианте осуществления концентрация железа в сыворотке крови субъекта снижается до менее чем 50% или менее чем 60% спустя от около 24 часов до около 30 часов после введения, например, внутривенно, перорально или подкожно.

[00123] В некоторых вариантах осуществления период полувыведения измеряют *in vitro* с помощью любого подходящего способа, известного в данной области, например, в некоторых вариантах осуществления стабильность аналога гепсидина настоящего изобретения определяют путем инкубации аналога гепсидина с предварительно нагретой человеческой сывороткой (Sigma) при 37 °C. Образцы отбирают в различные временные точки, обычно до 24 часов, и стабильность образца анализируют путем отделения аналога гепсидина от белков сыворотки и последующего анализа на присутствие искомого аналога гепсидина с помощью ЖХ-МС.

[00124] В некоторых вариантах осуществления стабильность аналога гепсидина измеряют *in vivo* с помощью любого подходящего способа, известного в данной области, например, в некоторых вариантах осуществления стабильность аналога гепсидина определяют *in vivo* путем введения пептида или пептидного димера субъекту, такому как человек или любое млекопитающее (например, мышь), после чего у субъекта берут образцы путем забора крови в различные временные точки, обычно до 24 часов. Затем образцы анализируют, как описано выше относительно способа измерения периода полувыведения *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления стабильность *in vivo* аналога гепсидина настоящего изобретения определяют с помощью способа, раскрытого в примерах настоящего документа.

[00125] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен аналог гепсидина, как описано в настоящем документе, причем аналог гепсидина имеет улучшенную растворимость или улучшенные характеристики агрегации по сравнению с эталонным гепсидином. Растворимость можно определить любым подходящим способом, известным в данной области. В некоторых вариантах осуществления подходящие способы для определения растворимости, известные в данной области, включают в себя инкубацию пептидов (например, аналога гепсидина настоящего изобретения) в различных буферах (ацетатном pH 4,0, ацетатном pH 5,0, фосфатно-цитратном pH 5,0, фосфатно-цитратном pH 6,0, фосфатном pH 6,0, фосфатном pH 7,0, фосфатном pH 7,5, сильном ФСБ pH 7,5, трис-буфере pH 7,5, трис-буфере pH 8,0, глициновом pH 9,0, воде, уксусной кислоте pH 5,0 и других, известных в данной области) и испытание на агрегацию или растворимость с помощью стандартных способов. К ним относятся, помимо прочего, визуальная преципитация, динамическое рассеяние света, круговой дихроизм и флуоресцентные красители для измерения гидрофобности поверхности и обнаружения агрегации или, например, фибрилляции. В

некоторых вариантах осуществления улучшенная растворимость означает, что пептид (например, аналог гепсидина настоящего изобретения) более растворим в данной жидкости, чем эталонный гепсидин.

[00126] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен аналог гепсидина, как описано в настоящем документе, причем аналог гепсидина имеет растворимость, увеличенную по меньшей мере примерно в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 или 200 раз, или по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% или 500%, чем у эталонного гепсидина в конкретном растворе или буфере, например, в воде или в буфере, известном в данной области или раскрытом в настоящем документе.

[00127] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен аналог гепсидина, как описано в настоящем документе, причем аналог гепсидина имеет уменьшенную агрегацию, при этом агрегация пептида в растворе по меньшей мере примерно в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 или 200 раз меньше, или по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% или 500% меньше, чем у эталонного гепсидина в конкретном растворе или буфере, например, в воде или в буфере, известном в данной области или раскрытом в настоящем документе.

[00128] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен аналог гепсидина, как описано в настоящем документе, причем аналог гепсидина проявляет меньшую деградацию (т. е. большую стабильность к деградации), например, меньше на более чем или около 10%, меньше на более чем или около 20%, меньше на более чем или около 30%, меньше на более чем или около 40% или меньше на более чем или около 50% по сравнению с эталонным гепсидином. В некоторых вариантах осуществления стабильность к деградации определяют любым подходящим способом, известным в данной области. В некоторых вариантах осуществления подходящие способы для определения стабильности к деградации, известные в данной области, включают в себя способ, описанный в работе Hawe et al J Pharm Sci, VOL. 101, NO. 3, 2012, p 895-913, включенный в настоящий документ в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления такие способы применяют для отбора активных последовательностей с увеличенными периодами полувыведения.

[00129] В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина настоящего изобретения получают синтетическим путем. В других вариантах осуществления аналог гепсидина настоящего изобретения получают с помощью рекомбинантных методик.

[00130] Различные мономерные и димерные пептиды аналога гепсидина изобретения могут быть сконструированы исключительно из природных аминокислот. В альтернативных вариантах эти аналоги гепсидина могут включать в себя неестественные или искусственные аминокислоты, в том числе, помимо прочего, модифицированные аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления модифицированные аминокислоты включают в себя природные аминокислоты, которые подверглись химической модификации для включения в себя группы, групп или химического фрагмента, который в естественных условиях не присутствует в аминокислоте. Аналоги гепсидина изобретения могут дополнительно включать в себя D-аминокислоты. Кроме того, пептидные мономеры и димеры аналога гепсидина изобретения могут включать в себя аналоги аминокислот. В конкретных вариантах осуществления пептидный аналог настоящего изобретения содержит любую из аминокислот, описанных в настоящем документе, причем один или более природных аминокислотных остатков пептидного аналога заменены неестественной или искусственной аминокислотой, или D-аминокислотой.

[00131] В некоторых вариантах осуществления аналоги гепсидина настоящего изобретения включают в себя одну или более модифицированных или неестественных аминокислот. Например, в некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина включает в себя одну или более аминокислот из Daba, Dapa, Pen, Sar, Cit, Cav, HLeu, 2-Nal, 1-Nal, d-1-Nal, d-2-Nal, Bip, Phe(4-OMe), Tyr(4-OMe), β hTrp, β hPhe, Phe(4-CF₃), 2-2-индан, 1-1-индан, циклобутил, β hPhe, hLeu, Gla, Phe(4-NH₂), hPhe, 1-Nal, Nle, 3-3-diPhe, циклобутил-Ala, Cha, Bip, β -Glu, Phe(4-Guan), гомоаминокислоты, D-аминокислоты и различные N-метилованные аминокислоты. Специалистам в данной области будет понятно, что другие модифицированные или неестественные аминокислоты, и различные другие замены природных аминокислот на модифицированные или неестественные аминокислоты могут быть выполнены для достижения подобных желаемых результатов, и что такие замены находятся в рамках идеи и сущности настоящего изобретения.

[00132] Настоящее изобретение включает в себя любой из описанных в настоящем документе аналогов гепсидина, например, в свободной или солевой форме.

[00133] Соединения, описанные в настоящем документе, включают в себя изотопно-меченые соединения, которые идентичны указанным в различных формулах и структурах, представленных в настоящем документе, за исключением того, что один или более атомов заменены атомом, имеющим атомную массу или массовое число, отличающееся от атомной массы или массового числа, обычно встречающихся в природе. Примеры изотопов, которые могут быть включены в настоящие соединения, включают в себя изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фтора и хлора, такие как ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl , соответственно. Некоторые изотопно-меченые соединения, описанные в настоящем документе, например, те, в которые включены радиоактивные изотопы, такие как ^3H и ^{14}C , используют для анализов распределения в тканях лекарственного средства и/или субстратов. Кроме того, замена на изотопы, такие как дейтерий, т. е. ^2H , может дать определенные терапевтические преимущества, обусловленные большей метаболической стабильностью, например, увеличить период полувыведения *in vivo* или снизить требования к дозировке.

[00134] Аналоги гепсидина настоящего изобретения включают в себя любой из описанных в настоящем документе пептидных мономеров или димеров, соединенных с линкерным фрагментом, включающим в себя любой из конкретных линкерных фрагментов, описанных в настоящем документе.

[00135] Аналоги гепсидина настоящего изобретения включают в себя пептиды, например, мономеры или димеры, содержащие пептидную мономерную субъединицу, имеющую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность аминокислотной последовательности пептидной последовательности аналога гепсидина, описанного в настоящем документе (например, любого из пептидов, раскрытых в настоящем документе), включая в себя, помимо прочего, любую из аминокислотных последовательностей, показанных в таблицах 2 и 3.

[00136] В некоторых вариантах осуществления пептидный аналог настоящего изобретения или мономерная субъединица димерного пептидного аналога настоящего

изобретения содержит или состоит из от 7 до 35 аминокислотных остатков, от 8 до 35 аминокислотных остатков, от 9 до 35 аминокислотных остатков, от 10 до 35 аминокислотных остатков, от 7 до 25 аминокислотных остатков, от 8 до 25 аминокислотных остатков, от 9 до 25 аминокислотных остатков, от 10 до 25 аминокислотных остатков, от 7 до 18 аминокислотных остатков, от 8 до 18 аминокислотных остатков, от 9 до 18 аминокислотных остатков или от 10 до 18 аминокислотных остатков, и, в качестве варианта, из одного или более дополнительных неаминокислотных фрагментов, таких как конъюгированный химический фрагмент, например, фрагмент, увеличивающий период полувыведения, ПЭГ или линкерный фрагмент. В конкретных вариантах осуществления мономерная субъединица аналога гепсидина содержит или состоит из 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 аминокислотных остатков. В конкретных вариантах осуществления мономерная субъединица аналога гепсидина настоящего изобретения содержит или состоит из от 10 до 18 аминокислотных остатков и, в качестве варианта, из одного или более дополнительных неаминокислотных фрагментов, таких как конъюгированный химический фрагмент, например, ПЭГ или линкерный фрагмент. В различных вариантах осуществления мономерная субъединица содержит или состоит из от 7 до 35 аминокислотных остатков, от 9 до 18 аминокислотных остатков или от 10 до 18 аминокислотных остатков. В конкретных вариантах осуществления любой из различных формул, описанных в настоящем документе, X содержит или состоит из от 7 до 35 аминокислотных остатков, от 8 до 35 аминокислотных остатков, от 9 до 35 аминокислотных остатков, от 10 до 35 аминокислотных остатков, от 7 до 25 аминокислотных остатков, от 8 до 25 аминокислотных остатков, от 9 до 25 аминокислотных остатков, от 10 до 25 аминокислотных остатков, от 7 до 18 аминокислотных остатков, от 8 до 18 аминокислотных остатков, от 9 до 18 аминокислотных остатков или от 10 до 18 аминокислотных остатков.

[00137] В некоторых вариантах осуществления аналоги гепсидина в соответствии с настоящим изобретением включают в себя любые и все аналоги гепсидина, раскрытые в публикациях патентных заявок PCT № WO2014/145561, WO2015/200916 или WO2017/117411, которые включены в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

Пептидные мономерные аналоги гепсидина

[00138] В конкретном аспекте в настоящем изобретении предложены способы лечения истинной полицитемии у нуждающегося в этом субъекта, включающие в себя введение субъекту аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли, или эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль.

[00139] В более конкретном аспекте в настоящем изобретении предложены способы лечения истинной полицитемии у нуждающегося в этом субъекта, включающие в себя введение субъекту эффективного количества аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции, содержащей аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль, а также фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель.

[00140] В одном варианте осуществления аналог гепсидина содержит пептид, содержащий формулу (I):

R1-X-Y-R2 (I) (SEQ ID NO: 1)

или ее фармацевтически приемлемую соль или сольват,

где

R1 представлен водородом, C1-C6-алкилом, C6-C12-арилом, C1-C20-алканоилом или pGlu;

R2 представлен NH₂ или OH;

X представлен пептидной последовательностью, имеющей формулу II

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 (II) (SEQ ID NO:2),

где

X1 представлен Asp, Ala, Ida, pGlu, bhAsp, Leu, D-Asp или отсутствует;

X2 представлен Thr, Ala или D-Thr;

X3 представлен His, Lys или D-His;

X4 представлен Phe, Ala, Dpa или D-Phe;

X5 представлен Pro, Gly, Arg, Lys, Ala, D-Pro или bhPro;

X6 представлен Ile, Cys, Arg, Lys, D-Ile или D-Cys;

X7 представлен Cys, Ile, Leu, Val, Phe, D-Ile или D-Cys;

X8 представлен Ile, Arg, Phe, Gln, Lys, Glu, Val, Leu или D-Ile;

X9 представлен Phe или bhPhe; и

X10 представлен Lys, Phe или отсутствует;

в которой, при отсутствии Y, X7 представлен Ile; и

Y представлен пептидной последовательностью, имеющей формулу III

Y1-Y2-Y3-Y4-Y5-Y6-Y7-Y8-Y9-Y10-Y11-Y12-Y13-Y14-Y15 (III) (SEQ ID NO:3),

где

Y1 представлен Gly, Cys, Ala, Phe, Pro, Glu, Lys, D-Pro, Val, Ser или отсутствует;

Y2 представлен Pro, Ala, Cys, Gly или отсутствует;

Y3 представлен Arg, Lys, Pro, Gly, His, Ala, Trp или отсутствует;

Y4 представлен Ser, Arg, Gly, Trp, Ala, His, Tyr или отсутствует;

Y5 представлен Lys, Met, Arg, Ala или отсутствует;

Y6 представлен Gly, Ser, Lys, Ile, Ala, Pro, Val или отсутствует;

Y7 представлен Trp, Lys, Gly, Ala, Ile, Val или отсутствует;

Y8 представлен Val, Thr, Gly, Cys, Met, Tyr, Ala, Glu, Lys, Asp, Arg или отсутствует;

Y9 представлен Cys, Tyr или отсутствует;

Y10 представлен Met, Lys, Arg, Tyr или отсутствует;

Y11 представлен Arg, Met, Cys, Lys или отсутствует;

Y12 представлен Arg, Lys, Ala или отсутствует;

Y13 представлен Arg, Cys, Lys, Val или отсутствует;

Y14 представлен Arg, Lys, Pro, Cys, Thr или отсутствует; и

Y15 представлен Thr, Arg или отсутствует;

где указанный пептид формулы I, в качестве варианта, пегилирован на R1, X или Y, и где боковая цепь аминокислоты пептида, в качестве варианта, конъюгирована с липофильным заместителем или полимерным фрагментом.

В сходном варианте осуществления формула II представлена указанной выше формулой со схожими X1, X2, X4, X5, X6, X7, X8, X9 и X1, однако X3 представлен His, Lys, D-His или D-Lys.

[00141] В одном варианте осуществления R1 представлен водородом, изовалериановой кислотой, изомасляной кислотой или ацетилом. В другом варианте осуществления R1 представлен изовалериановой кислотой или изомасляной кислотой. В конкретном варианте осуществления R1 представлен изовалериановой кислотой.

[00142] В одном варианте осуществления X представлен пептидной последовательностью, имеющей формулу IV:

X1-Thr-His-X4-X5-X6-X7-X8-Phe-X10 (IV) (SEQ ID NO:4),

где

X1 представлен Asp, Ida, pGlu, bhAsp или отсутствует;

X4 представлен Phe или Dpa;

X5 представлен Pro или bhPro;

X6 представлен Ile, Cys или Arg;

X7 представлен Cys, Ile, Leu или Val;

X8 представлен Ile, Lys, Glu, Phe, Gln или Arg; и

X10 представлен Lys или отсутствует.

[00143] В другом варианте осуществления X представлен пептидной последовательностью, имеющей формулу V:

X1-Thr-His-X4-X5-Cys-Ile-X8-Phe-X10 (V) (SEQ ID NO:5),

X1 представлен Asp, Ida, pGlu, bhAsp или отсутствует;

X4 представлен Phe или Dra;

X5 представлен Pro или bhPro;

X8 представлен Ile, Lys, Glu, Phe, Gln или Arg; и

X10 представлен Lys или отсутствует.

[00144] В конкретном варианте осуществления пептид соответствует формуле VI:

R^1 -X-Y- R^2 (VI) (SEQ ID NO:6)

или ее фармацевтически приемлемой соли, где:

R^1 представлен водородом, изовалериановой кислотой, изомасляной кислотой или ацетилом;

R^2 представлен $-NH_2$ или $-OH$;

X представлен пептидной последовательностью, имеющей формулу VII:

X1-Thr-His-X4-X5-Cys-Ile-X8-Phe-X10 (VII) (SEQ ID NO:7),

где

X1 представлен Asp, Ida, pGlu, bhAsp или отсутствует;

X4 представлен Phe или Dra;

X5 представлен Pro или bhPro;

X8 представлен Ile, Lys, Glu, Phe, Gln или Arg; и

X10 представлен Lys или отсутствует;

где Y представлен пептидной последовательностью, имеющей формулу VIII:

Y1-Pro-Y3-Ser-Y5-Y6-Y7-Y8-Cys-Y10 (VIII) (SEQ ID NO:8),

где

Y1 представлен Gly, Glu, Val или Lys;

Y3 представлен Arg или Lys;

Y5 представлен Arg или Lys;

Y6 представлен Gly, Ser, Lys, Ile или Arg;

Y7 представлен Trp или отсутствует;

Y8 представлен Val, Thr, Asp, Glu или отсутствует; и

Y10 представлен Lys или отсутствует;

причем пептид имеет дисульфидную связь между двумя Cys;

при этом указанный пептид формулы I, в качестве варианта, пегилирован на R¹, X или Y;

причем боковая цепь аминокислоты пептида, в качестве варианта, конъюгирована с липофильным заместителем или полимерным фрагментом; и

при этом Ida представлен иминодиуксусной кислотой; pGlu представлен пироглутаминовой кислотой; bhAsp представлен β-гомоаспарагиновой кислотой; и bhPro представлен β-гомопролином.

[00145] В дополнительном конкретном варианте осуществления пептид содержит одну из следующих последовательностей:

DTHFPICIFGPRSKGWVC (SEQ ID NO:9);

DTHFPCIFGPRSKGWVCK (SEQ ID NO:10);

DTHFPCIFEPKSGWVCK (SEQ ID NO:11);

DTHFPCIFGPRSKGWACK (SEQ ID NO:12);

DTHFPCIFGPRSKGWVCKK (SEQ ID NO:13);

DTHFPCIFVCHRPKGCYRRVCR (SEQ ID NO:14);

DTHFPCIKFGPRSKGWVCK (SEQ ID NO:15);

DTHFPCIKFKPRSKGWVCK (SEQ ID NO:16);

DTHFPCIFGPRSRGWVCK (SEQ ID NO:17);

DTHFPCIKFGPKSKGWVCK (SEQ ID NO:18);

DTHFPCIKFEPRSKGCK (SEQ ID NO:19);

DTHFPCIKFEPKSKGWECK (SEQ ID NO:20);

DTHFPCIKFEPRSKKCK (SEQ ID NO:21);

DTHFPCIKFEPRSKGCKK (SEQ ID NO:22);

DTHFPCIKFKPRSKGCK (SEQ ID NO:23);

DTHFPCIKFEPKSKGCK (SEQ ID NO:24);

DTHFPCIKF (SEQ ID NO:25);

DTHFPCIF (SEQ ID NO:26) или

DTKFPCIF (SEQ ID NO:27),

причем указанный пептид, в качестве варианта, пегилирован на R1, X или Y, и при этом боковая цепь аминокислоты пептида, в качестве варианта, конъюгирована с липофильным заместителем или полимерным фрагментом.

[00146] В дополнительном конкретном варианте осуществления гепсидиновый аналог или пептид содержит одну из следующих последовательностей:

изовалериановая кислота-DTHFPICIFGPRSKGWVC-NH₂ (SEQ ID NO:9);

изовалериановая кислота-DTHFPCIFGPRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:10);

изовалериановая кислота-DTHFPCIIFEPRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:11);

изовалериановая кислота-DTHFPCIIFGPRSKGWACK-NH₂ (SEQ ID NO:12);

изовалериановая кислота-DTHFPCIIFGPRSKGWVCKK-NH₂ (SEQ ID NO:13);

изовалериановая кислота-DTHFPCIIFVCHRPKGCYRRVCR-NH₂ (SEQ ID NO:14);

изовалериановая кислота-DTHFPCI(K(PEG8))FGPRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:28);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKF(K(PEG8))PRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:16);

изовалериановая кислота-DTHFPICIFGPRS(K(PEG8))GWVC-NH₂ (SEQ ID NO:29);

изовалериановая кислота-DTHFPICIFGPRS(K(PEG4))GWVC-NH₂ (SEQ ID NO:30);

изовалериановая кислота-DTHFPCIIFGPRSRGWVC(K(PEG8))-NH₂ (SEQ ID NO:31);

изовалериановая кислота-DTHFPCIIFGPRSRGWVC(K(PEG4))-NH₂ (SEQ ID NO:32);

изовалериановая кислота-DTHFPCIIFGPRSRGWVC(K(PEG2))-NH₂ (SEQ ID NO:33);

изовалериановая кислота-DTHFPCI(K(Palm))FGPRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:34);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKF(K(Palm))PRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:35);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKFGP(K(Palm))SKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:36);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKFGPRS(K(Palm))GWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:37);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKFGPRSKGWVC(K(Palm))NH₂ (SEQ ID NO:38);

изовалериановая кислота-DTHFPCI(K(PEG3-Palm))FGPRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:39);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKF(K(PEG3-Palm))PRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:40);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKFGP(K(PEG3-Palm))SKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:41);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKFGPRS(K(PEG3-Palm))GWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:42);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKFGPRSKGWVC(K(PEG3-Palm))-NH₂ (SEQ ID NO:43);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKFGPRSKGWVC(K(PEG8))-NH₂ (SEQ ID NO:44);

изовалериановая кислота-DTHFPCI(K(isoGlu-Palm))FEPRSKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:45);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKF-K(isoGlu-Palm)-PRSKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:46);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKFEP(K(isoGlu-Palm))SKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:47);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKFEP(K(isoGlu-Palm))SKGWECK-NH₂ (SEQ ID NO:20);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKFEPRS(K(isoGlu-Palm))GCK-NH₂ (SEQ ID NO:48);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKFEPRSK(K(isoGlu-Palm))CK-NH₂ (SEQ ID NO:21);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKFEPRSKGCK(K(isoGlu-Palm))-NH₂ (SEQ ID NO:49);

изовалериановая кислота-DTHFPCI-K(Dapa-Palm)-FEPRSKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:50);

изовалериановая кислота-DTHFPCIK(F(Dapa-Palm))PRSKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:23);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKFEP(K(Dapa-Palm))SKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:24);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKFEPRS(K(Dapa-Palm))GCK-NH₂ (SEQ ID NO:51);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKFEPRSK(K(Dapa-Palm))CK-NH₂ (SEQ ID NO:52);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKFEPRSKGC(K(Dapa-Palm))K-NH₂ (SEQ ID NO:53);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKFEPRSKGC(K(Dapa-Palm))-NH₂ (SEQ ID NO:54);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKF(K(PEG11-Palm))PRSK[Sar]CK-NH₂ (SEQ ID NO:55);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKF-NH₂ (SEQ ID NO:25);

Hy-DTHFPCIKF-NH₂ (SEQ ID NO:25);

изовалериановая кислота-DTHFPCIIF-NH₂ (SEQ ID NO:26);

Hy-DTHFPCIIF-NH₂ (SEQ ID NO:26);

изовалериановая кислота-DTKFPCIIF-NH₂ (SEQ ID NO:27) или

Hy-DTKFPCIIF-NH₂ (SEQ ID NO:27).

[00147] В более конкретном варианте осуществления гепсидиновый аналог или пептид представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIIFGPRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:10).

[00148] В более конкретном варианте осуществления гепсидиновый аналог или пептид представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIIFEPRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:11).

[00149] В более конкретном варианте осуществления гепсидиновый аналог или пептид представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCI(K(PEG8))FGPRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:28).

[00150] В более конкретном варианте осуществления гепсидиновый аналог или пептид представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKF(K(PEG8))PRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:16).

[00151] В более конкретном варианте осуществления гепсидиновый аналог или пептид представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIIFGPRSRGWVC(K(PEG8))-NH₂ (SEQ ID NO:31).

[00152] В более конкретном варианте осуществления гепсидиновый аналог или пептид представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCI(K(Palm))FGPRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:34).

[00153] В более конкретном варианте осуществления гепсидиновый аналог или пептид представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKF(K(Palm))PRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:35).

[00154] В более конкретном варианте осуществления гепсидиновый аналог или пептид представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKFGP(K(Palm))SKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:36).

[00155] В более конкретном варианте осуществления гепсидиновый аналог или пептид представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKFGPRSKGWVC(K(Palm))-NH₂ (SEQ ID NO:38)

[00156] В более конкретном варианте осуществления гепсидиновый аналог или пептид представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCI(K(PEG3-Palm))FGPRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:39).

[00157] В более конкретном варианте осуществления гепсидиновый аналог или пептид представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKF(K(PEG3-Palm))PRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:40).

[00158] В более конкретном варианте осуществления гепсидиновый аналог или пептид представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKFGP(K(PEG3-Palm))SKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:41).

[00159] В более конкретном варианте осуществления гепсидиновый аналог или пептид представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKFGPRS(K(PEG3-Palm))GWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:42).

[00160] В более конкретном варианте осуществления гепсидиновый аналог или пептид представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKFGPRSKGWVC(K(PEG3-Palm))-NH₂ (SEQ ID NO:43).

[00161] В более конкретном варианте осуществления гепсидиновый аналог или пептид представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKFGPRSKGWVC(K(PEG8))-NH₂ (SEQ ID NO:44).

[00162] В более конкретном варианте осуществления гепсидиновый аналог или пептид представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCI(K(isoGlu-Palm))FEPRSKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:45).

[00163] В более конкретном варианте осуществления гепсидиновый аналог или пептид представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIK(K(isoGlu-Palm))PRSKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:46).

[00164] В более конкретном варианте осуществления гепсидиновый аналог или пептид представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKFEP(K(isoGlu-Palm))SKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:47).

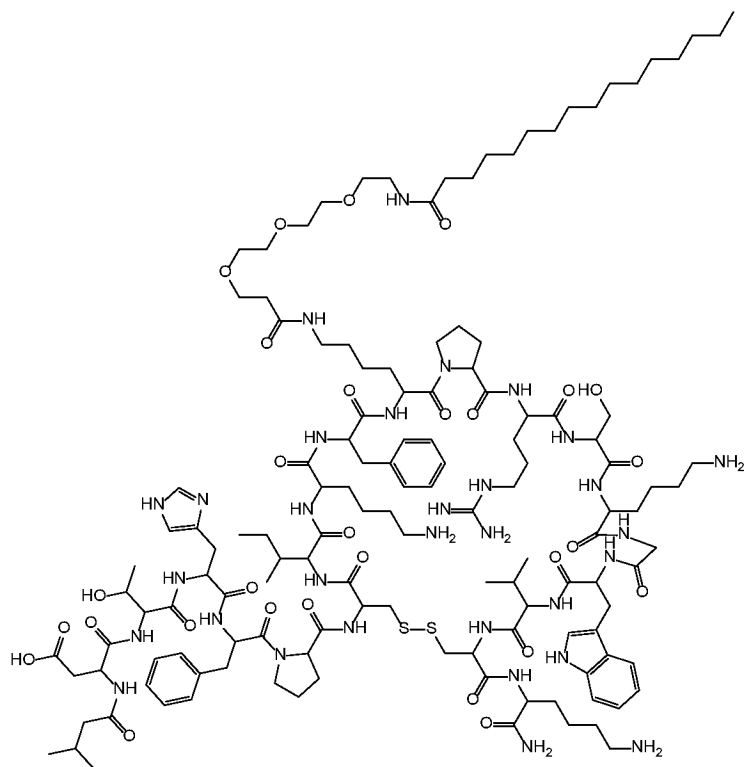
[00165] В более конкретном варианте осуществления гепсидиновый аналог или пептид представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKFEP(K(isoGlu-Palm))GCK-NH₂ (SEQ ID NO:48).

[00166] В более конкретном варианте осуществления гепсидиновый аналог или пептид представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCI(K(Dapa-Palm))FEPRSKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:50).

[00167] В более конкретном варианте осуществления гепсидиновый аналог или пептид представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKFEP(K(Dapa-Palm))SKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:24)

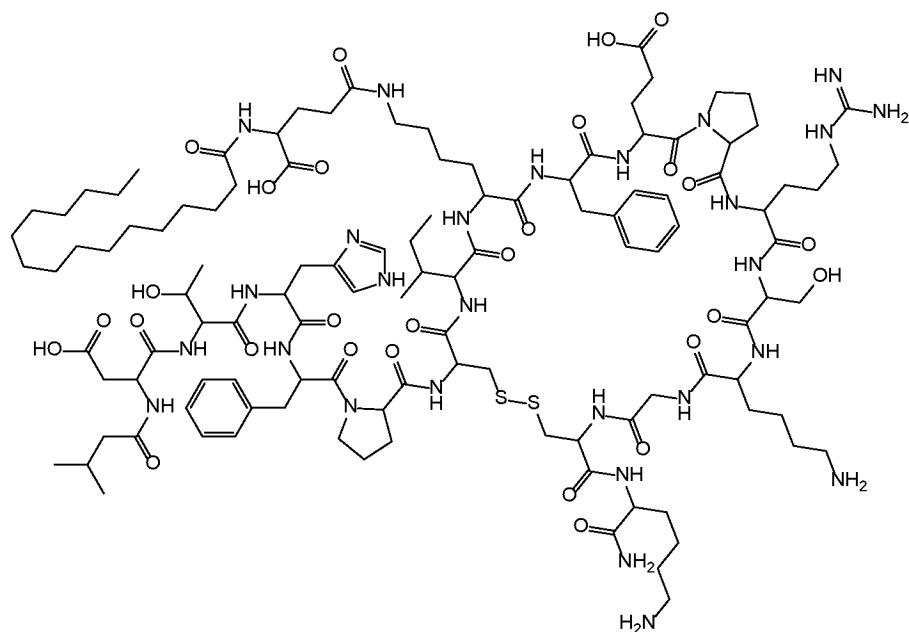
[00168] В более конкретном варианте осуществления гепсидиновый аналог или пептид выбран из группы, состоящей из:

(a)



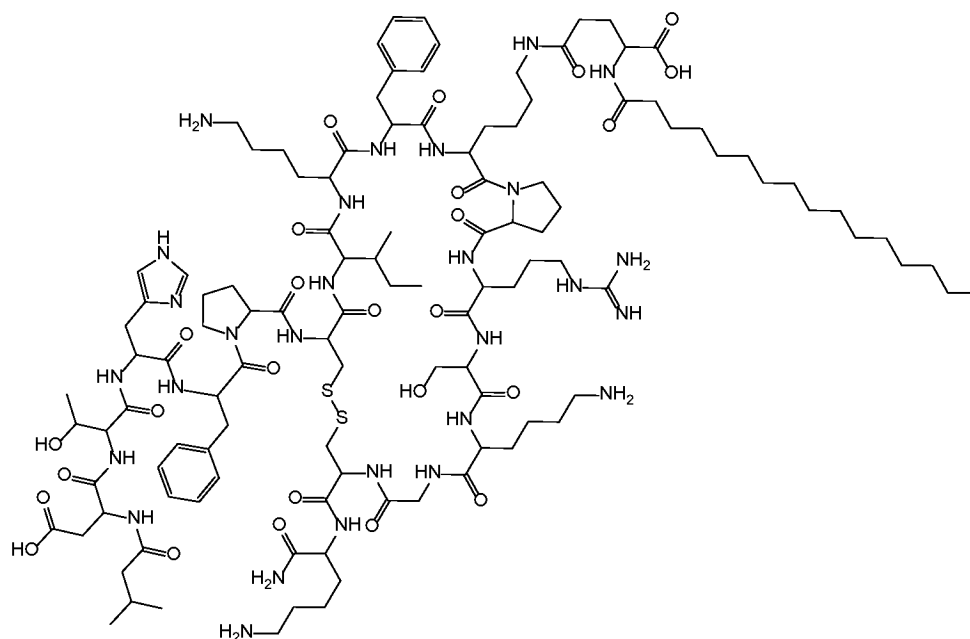
изовалериановой кислоты-DTHFPCIK(K(PEG3-Palm))PRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:40);

(b)



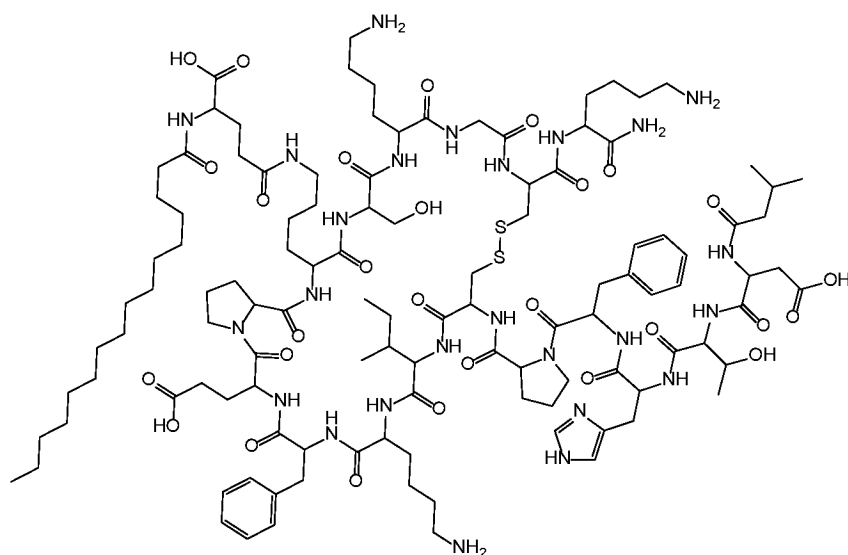
изовалериановой кислоты-DTHFPCI(K(isoGlu-Palm))FEPRSKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:45);

(c)



изовалериановой кислоты-DTHFPCIKF(K(isoGlu-Palm))PRSKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:46);

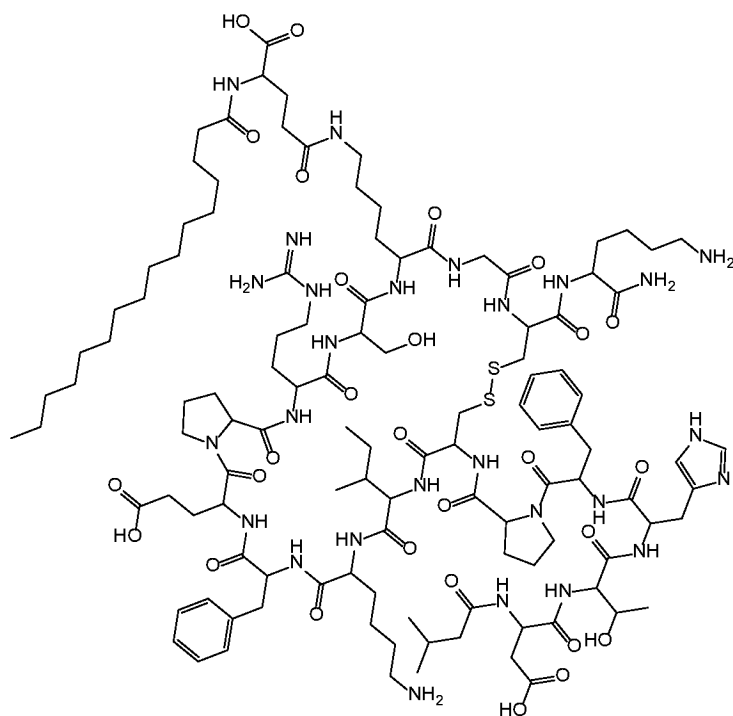
(d)



изовалериановой кислоты-DTHFPCIKFEP(K(isoGlu-Palm))SKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:47)

и

(e)



изовалериановой кислоты-DTHFPCIKFEPRS(K(isoGlu-Palm))GCK-NH₂(SEQ ID NO:48), и фармацевтически приемлемых солей любого из вышеупомянутых соединений, причем аминокислоты представляют собой L-аминокислоты.

[00169] В некоторых вариантах осуществления аналоги гепсидина настоящего изобретения активны в димерной конформации, в частности, когда в пептиде присутствуют свободные остатки цистеина. В некоторых вариантах осуществления это происходит либо в виде синтезированного димера, либо, в частности, при наличии свободного цистеинового мономера пептида, который в условиях окисления димеризуется. В некоторых вариантах осуществления димер представляет собой гомодимер. В других вариантах осуществления димер представляет собой гетеродимер.

[00170] В некоторых вариантах осуществления димер аналога гепсидина настоящего изобретения представляет собой пептидный димер, содержащий два пептидных мономера аналога гепсидина изобретения.

[00171] В определенном варианте осуществления настоящее изобретение включает в себя полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в настоящем документе, или имеющий любую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94% или по меньшей мере 95% идентичностью с любой из этих аминокислотных

последовательностей. В сходных вариантах осуществления настоящее изобретение включает в себя димер, содержащий два полипептида, каждый из которых содержит аминокислотную последовательность, изложенную в настоящем документе, или имеющий любую аминокислотную последовательность с по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94% или по меньшей мере 95% идентичностью с любой из этих аминокислотных последовательностей.

[00172] В конкретных вариантах осуществления мономерные субъединицы могут быть димеризованы дисульфидным мостиком между двумя остатками цистеина, по одному в каждой пептидной мономерной субъединице, или они могут быть димеризованы другим подходящим линкерным фрагментом, в том числе описанными в настоящем документе. Некоторые мономерные субъединицы показаны с С- и/или N-концами, оба из которых содержат свободный амин. Таким образом, для получения ингибитора пептидного димера мономерная субъединица может быть модифицирована для удаления С- или N-концевого свободного амина, что делает возможным димеризацию на оставшемся свободном амине. Кроме того, в некоторых случаях терминальный конец одной или более мономерных субъединиц ацилируется ацилирующим органическим соединением, выбранным из группы, состоящей из 2-ме-трифторбутила, трифторпентила, ацетила, октонила, бутила, пентила, гексила, пальмитила, трифторметилмасляной, циклопентанкарбоновой, циклопропилуксусной, 4-фторбензойной, 4-фторфенилуксусной, 3-фенилпропионовой, тетраэдро-2Н-пиран-4карбоновой, янтарной и глутаровой кислот. В некоторых случаях мономерные субъединицы содержат как свободный карбоксиконец, так и свободный аминоконец, что позволяет пользователю выборочно модифицировать субъединицу для достижения димеризации на желаемом конце. Специалистам в данной области, таким образом, будет понятно, что мономерные субъединицы настоящего изобретения могут быть выборочно модифицированы для получения одного, конкретного амина для желаемой димеризации.

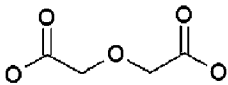
[00173] Также предполагается, что С-концевые остатки мономерных субъединиц, раскрытых в настоящем документе, могут представлять собой амиды, если не указано иное. Кроме того, предполагается, что в некоторых вариантах осуществления димеризация на С-конце облегчается за счет применения подходящей аминокислоты с боковой цепью, имеющей аминную функциональность, как это обычно понимается в данной области. Что касается N-концевых остатков, то, как правило, предполагается,

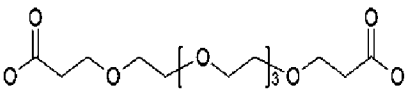
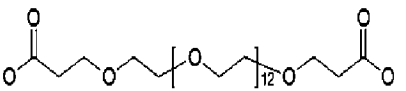
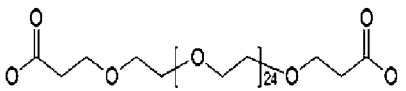
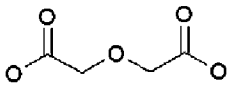
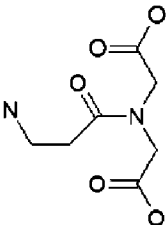
что димеризация может быть достигнута за счет свободного амина концевого остатка или путем применения подходящей боковой цепи аминокислоты, имеющей свободный амин, как это обычно понимается в данной области.

[00174] Более того, предполагается, что боковые цепи одного или более внутренних остатков, входящих в состав пептидных мономеров аналога гепсидина настоящего изобретения, могут применяться для димеризации. В таких вариантах осуществления боковая цепь в некоторых вариантах осуществления представляет собой подходящую природную аминокислоту (например, Lys) или, в качестве варианта, представляет собой неестественную аминокислоту, содержащую боковую цепь, подходящую для конъюгации, например, с подходящим линкерным фрагментом, как определено в настоящем документе.

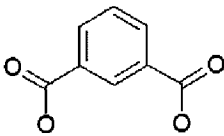
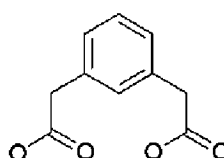
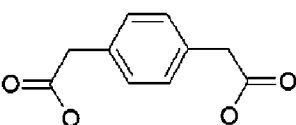
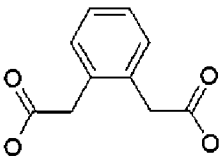
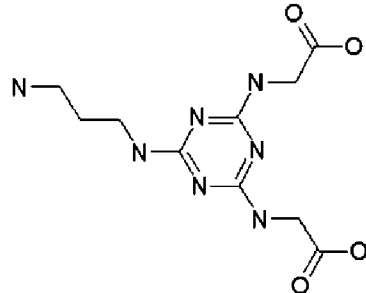
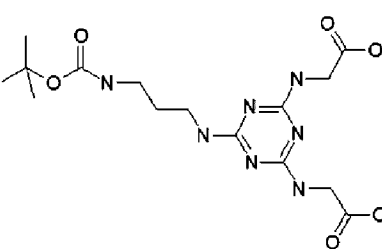
[00175] Линкерные фрагменты, соединяющие мономерные субъединицы, могут иметь любую структуру, длину и/или размер, не противоречащие идеям, изложенным в настоящем документе. По меньшей мере в одном варианте осуществления линкерный фрагмент выбран из неограничивающей группы, состоящей из: цистеина, лизина, DIG, PEG4, PEG4-биотина, PEG13, PEG25, PEG1K, PEG2K, PEG3.4K, PEG4K, PEG5K, IDA, IDA-Palm, ADA, бок-IDA, глутаровой кислоты, изофталевой кислоты, 1,3-фенилендиуксусной кислоты, 1,4-фенилендиуксусной кислоты, 1,2-фенилендиуксусной кислоты, триазина, бок-триазина, IDA-биотина, PEG4-биотина, AADA, подходящих алифатических соединений, ароматических соединений, гетероароматических соединений и линкеров на основе полиэтиленгликоля, имеющих молекулярную массу от около 400 Да до около 40 000 Да. Неограничивающие примеры подходящих линкерных фрагментов приведены в таблице 2. В конкретном варианте осуществления любой из этих линкерных фрагментов может, в качестве варианта, связывать фрагмент, увеличивающий период полувыведения, с аналогом гепсидина.

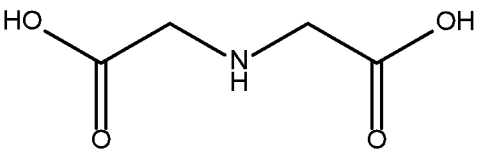
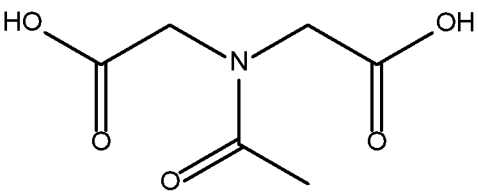
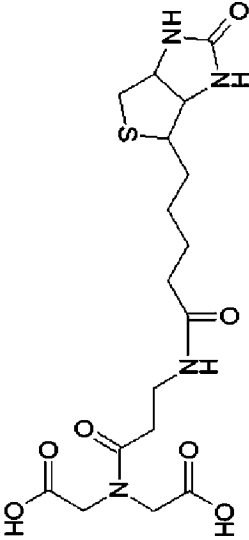
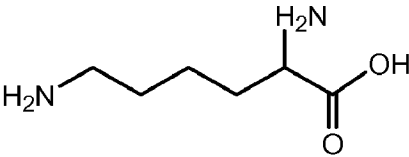
Таблица 2. Иллюстративные примеры линкерных фрагментов

Сокращение	Описание	Структура
DIG	Дигликолевая кислота	

Сокращение	Описание	Структура
PEG4	Бифункциональный ПЭГ-линкер с 4 молекулами полиэтиленгликоля	
PEG13	Бифункциональный ПЭГ-линкер с 13 молекулами полиэтиленгликоля	
PEG25	Бифункциональный ПЭГ-линкер с 25 молекулами полиэтиленгликоля	
PEG1K	Бифункциональный ПЭГ-линкер с полиэтиленгликолем мол. м. 1000 Да	
PEG2K	Бифункциональный ПЭГ-линкер с полиэтиленгликолем мол. м. 2000 Да	
PEG3.4K	Бифункциональный ПЭГ-линкер с полиэтиленгликолем мол. м. 3400 Да	
PEG5K	Бифункциональный ПЭГ-линкер с полиэтиленгликолем мол. м. 5000 Да	
DIG	Дигликолевая кислота	
β-Ala-IDA	β-Ala-иминодиуксусная кислота	

Сокращение	Описание	Структура
Бок-β-Ala-IDA	Бок-β-Ala-иминодиуксусная кислота	
Ас-β-Ala-IDA	Ас-β-Ala-иминодиуксусная кислота	
Palm-β-Ala-IDA-	Пальмитил-β-Ala-иминодиуксусная кислота	
GTA	Глутаровая кислота	
PMA	Пимелиновая кислота	
AZA	Азелаиновая кислота	
DDA	Додекандиовая кислота	

Сокращение	Описание	Структура
IPA	Изофталевая кислота	
1,3-PDA	1,3-фенилендиуксусная кислота	
1,4-PDA	1,4-фенилендиуксусная кислота	
1,2-PDA	1,2-фенилендиуксусная кислота	
Триазин	Аминопропилтриазиновая двухосновная кислота	
Бок-триазин	Бок-триазиновая двухосновная кислота	

Сокращение	Описание	Структура
IDA	Иминодиуксусная кислота	 <chem>OC(=O)CNCC(=O)O</chem>
AIDA	н-ацетилиминоуксусная кислота	 <chem>CC(=O)N(CC(=O)O)CC(=O)O</chem>
Биотин-β- ala-IDA-	N-биотин-β-Ala- иминодиуксусная кислота	 <chem>OC(=O)CN(CC(=O)O)CC(=O)NCCCCC1[C@H]2C[C@@H](C1)NC(=O)N2C3=CC=CC=C3</chem>
Lys	Лизин	 <chem>NC(CCCCNC(=O)O)N</chem>

[00176] Специалистам в данной области будет понятно, что С- и N-концевые, а также внутренние линкерные фрагменты, раскрытые в настоящем документе, являются

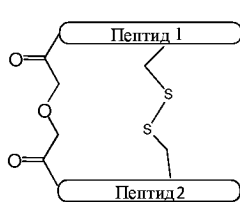
неограничивающими примерами подходящих линкерных фрагментов, и что настоящее изобретение может включать в себя любой подходящий линкерный фрагмент.

[00177] В некоторых вариантах осуществления любого из пептидных димеров аналога гепсидина N-концы каждой пептидной мономерной субъединицы соединены линкерным фрагментом.

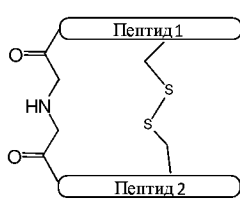
[00178] В некоторых вариантах осуществления любого из пептидных димеров аналога гепсидина C-концы каждой пептидной мономерной субъединицы соединены линкерным фрагментом.

[00179] В некоторых вариантах осуществления боковые цепи одного или более внутренних аминокислотных остатков (например, остатков Lys), входящих в состав каждой пептидной мономерной субъединицы пептидного димера аналога гепсидина, соединены линкерным фрагментом.

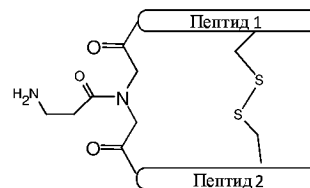
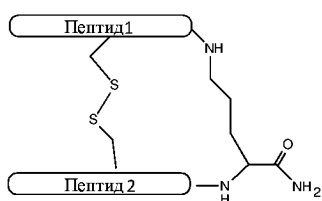
[00180] В некоторых вариантах осуществления любого из пептидных димеров аналога гепсидина C-конец, N-конец или внутренняя аминокислота (например, боковая цепь лизина) каждой пептидной мономерной субъединицы соединены линкерным фрагментом, и по меньшей мере два остатка цистеина или Реп в пептидных димерах аналога гепсидина соединены дисульфидным мостиком. В некоторых вариантах осуществления пептидный димер имеет общую структуру, приведенную ниже. Неограничивающие схематические примеры таких аналогов гепсидина приведены в следующей иллюстрации:



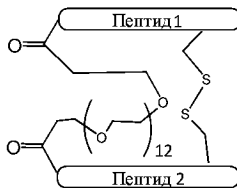
DIG (Диэтиленгликоль)



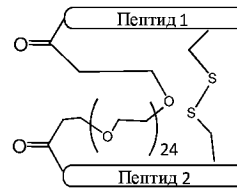
IDA (Иминодиуксусная кислота)

 β -Ala-IDA

Lys



PEG13



PEG25

Конъюгаты пептидных аналогов

[00181] В некоторых вариантах осуществления аналоги гепсидина настоящего изобретения, включающие в себя как мономеры, так и димеры, содержат один или более конъюгированных химических заместителя, таких как липофильные заместители и полимерные фрагменты, совместно именуемые в настоящем документе фрагментами, увеличивающими период полувыведения. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, авторы полагают, что липофильный заместитель связывается с альбумином в кровотоке, тем самым защищая аналог гепсидина от ферментативной деградации и таким образом увеличивая период его полувыведения. Кроме того, считается, что полимерные фрагменты увеличивают период полувыведения и уменьшают клиренс в кровотоке, а в некоторых случаях увеличивают проницаемость через эпителий и задержку в собственной пластинке слизистой оболочки. Кроме того, также предполагается, что эти заместители в некоторых случаях могут увеличивать проницаемость через эпителий и задержку в собственной пластинке слизистой оболочки. Специалистам хорошо известны подходящие методы получения соединений, используемых в контексте изобретения. Примеры неограничивающих подходящих химических соединений см., например, в WO98/08871, WO00/55184, WO00/55119, Madsen et al (J. Med. Chem. 2007, 50, 6126-32) и Knudsen et al. 2000 (J. Med. Chem. 43, 1664-1669).

[00182] В одном варианте осуществления боковые цепи одного или более аминокислотных остатков (например, остатков Lys) в аналоге гепсидина изобретения дополнительно конъюгированы (например, ковалентно присоединены) с липофильным заместителем или другим фрагментом, увеличивающим период полувыведения. Липофильный заместитель может быть ковалентно связан с атомом в боковой цепи аминокислоты или, в качестве варианта, может быть конъюгирован с боковой цепью аминокислоты посредством одного или более спейсеров или линкерных фрагментов. В присутствии спейсерного или линкерного фрагмента может образовываться расстояние между аналогом гепсидина и липофильным заместителем. В конкретных вариантах осуществления фрагмент, увеличивающий период полувыведения, конъюгирован с аналогом гепсидина посредством линкерного фрагмента, который в некоторых вариантах осуществления представляет собой линкерный фрагмент, приведенный в таблице 2 или раскрытый или изображенный в любой из таблиц 2–7.

[00183] В некоторых вариантах осуществления липофильный заместитель или фрагмент, увеличивающий период полувыведения, содержит углеводородную цепь, имеющую от 4 до 30 атомов С, например, по меньшей мере 8 или 12 атомов С, и предпочтительно 24 атома С или меньше, или 20 атомов С или меньше. Углеводородная цепь может быть линейной или разветвленной, а также может быть насыщенной или ненасыщенной. В некоторых вариантах осуществления углеводородная цепь замещена фрагментом, который является частью присоединения к боковой цепи аминокислоты или спейсера, например, ацильной группой, сульфонильной группой, атомом N, атомом O или атомом S. В некоторых вариантах осуществления углеводородная цепь заменена ацильной группой, и, соответственно, углеводородная цепь может быть частью алканоильной группы, например, пальмитоила, капроила, лауроила, миристоила или стеароила.

[00184] Липофильный заместитель может быть конъюгирован с боковой цепью любой аминокислоты в аналоге гепсидина изобретения. В определенном варианте осуществления боковая цепь аминокислоты включает в себя карбоксильную, гидроксильную, тиольную, амидную или аминную группу для образования сложного эфира, сульфонилового эфира, тиоэфира, амида или сульфонамида со спейсером или липофильным заместителем. Например, липофильный заместитель может быть конъюгирован с Asn, Asp, Glu, Gln, His, Lys, Arg, Ser, Thr, Tyr, Trp, Cys или Dbu, Dpg или Orn. В некоторых вариантах осуществления липофильный заместитель конъюгирован с Lys. Аминокислота, показанная как Lys в любой из приведенных в настоящем документе формул, может быть заменена, например, на Dbu, Dpg или Orn, если добавлен липофильный заместитель.

[00185] В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, в качестве варианта или дополнительно, боковые цепи одного или более аминокислотных остатков в аналоге гепсидина изобретения могут быть конъюгированы с полимерным фрагментом или другим фрагментом, увеличивающим период полувыведения, например, для увеличения растворимости и/или периода полувыведения *in vivo* (например, в плазме) и/или биодоступности. Известно также, что такие модификации снижают клиренс (например, почечный клиренс) терапевтических белков и пептидов.

[00186] В контексте настоящего документа «полиэтиленгликоль» или «ПЭГ» представляет собой полиэфирное соединение общей формулы $\text{H}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{OH}$. ПЭГ, также известные как полиэтиленоксиды (ПЭО) или полиоксиэтилены (ПОЭ), в

зависимости от их молекулярной массы ПЭО, ПЭЭ или ПОГ в контексте настоящего документа относятся к олигомеру или полимеру этиленоксида. Эти три названия химически синонимичны, однако ПЭГ обычно относится к олигомерам и полимерам с молекулярной массой менее 20 000 г/моль, ПЭО — к полимерам с молекулярной массой более 20 000 г/моль, а ПОЭ — к полимерам с любой молекулярной массой. ПЭГ и ПЭО в зависимости от их молекулярного веса представляют собой жидкости или низкоплавкие твердые вещества. В настоящем изобретении эти 3 названия применяются эквивалентно. ПЭГ получают путем полимеризации этиленоксида и поставляются на рынок в широком диапазоне молекулярного веса от 300 г/моль до 10 000 000 г/моль. Несмотря на то, что ПЭГ и ПЭО с разным молекулярным весом находят применение в различных областях и из-за длины цепи обладают разными физическими свойствами (например, вязкостью), их химические свойства практически идентичны. Полимерный фрагмент предпочтительно является водорастворимым (амфифильным или гидрофильным), нетоксичным и фармацевтически инертным. Подходящие полимерные фрагменты включают в себя полиэтиленгликоли (ПЭГ), гомо- или сополимеры ПЭГ, монометилзамещенный полимер ПЭГ (мПЭГ) или полиоксиэтиленглицерин (ПОГ). См., например, *Int. J. Hematology* 68:1 (1998); *Bioconjugate Chem.* 6:150 (1995); and *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Sys.* 9:249 (1992). К ним также относят ПЭГ, приготовленные для увеличения периода полувыведения, например, моноактивированные, алкокси-терминированные полиалкиленоксиды (ПОА), такие как монометокси-терминированные полиэтиленгликоли (мПЭГ), а также рассматриваются бис-активированные полиэтиленоксиды (гликоли) или другие производные ПЭГ. Для целей настоящего изобретения обычно выбирают подходящие полимеры, существенно различающиеся по весу, в диапазоне от около 200 до около 40 000. В некоторых вариантах осуществления применяют ПЭГ с молекулярной массой от 200 до 2 000 дальтон или от 200 до 500 дальтон. Также могут применяться различные формы ПЭГ в зависимости от инициатора, применяемого для процесса полимеризации, например, распространенным инициатором является монофункциональный метиловый эфир ПЭГ, или метоксиполи(этиленгликоль), сокращенно мПЭГ. Другие подходящие инициаторы известны в данной области и подходят для применения в настоящем изобретении.

[00187] Также подходят ПЭГ с низкой молекулярной массой в виде чистых олигомеров, называемых монодисперсными, однородными или дискретными. Их применяют в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения.

[00188] Также подходят ПЭГ с различной геометрией: разветвленные ПЭГ имеют от трех до десяти цепей ПЭГ, исходящих из центральной основной группы; звездчатые ПЭГ имеют от 10 до 100 цепей ПЭГ, исходящих из центральной основной группы; и гребенчатые ПЭГ имеют несколько цепей ПЭГ, обычно привитых к полимерному остову. ПЭГ также могут быть линейными. Цифры, которые часто включены в названия ПЭГ, указывают на их средний молекулярный вес (например, ПЭГ с $n = 9$ будет иметь средний молекулярный вес приблизительно 400 дальтон и будет обозначаться как ПЭГ 400.

[00189] В контексте настоящего документа «пэгилирование» представляет собой процесс соединения (например, ковалентного) ПЭГ-структуры с аналогом гепсидина изобретения, который в некоторых вариантах осуществления называется «пэгилированным аналогом гепсидина». В некоторых вариантах осуществления ПЭГ пэгилированной боковой цепи представляет собой ПЭГ с молекулярным весом от около 200 до около 40 000. В некоторых вариантах осуществления участок ПЭГ конъюгированного фрагмента, увеличивающего период полувыведения, представлен ПЭГ3, ПЭГ4, ПЭГ5, ПЭГ6, ПЭГ7, ПЭГ8, ПЭГ9, ПЭГ10 или ПЭГ11. В конкретных вариантах осуществления он представлен ПЭГ11. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ пэгилированного спейсера представлен ПЭГ3 или ПЭГ8. В некоторых вариантах осуществления спейсер является пэгилированным. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ пэгилированного спейсера представлен ПЭГ3, ПЭГ4, ПЭГ5, ПЭГ6, ПЭГ7, ПЭГ8, ПЭГ9, ПЭГ10 или ПЭГ11. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ пэгилированного спейсера представлен ПЭГ3 или ПЭГ8.

[00190] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает в себя пептид аналога гепсидина (или его димер), конъюгированный с ПЭГ, который присоединен ковалентно, например, с помощью амида, тиола, посредством клик-химической реакции или любым другим подходящим способом, известным в данной области. В конкретных вариантах осуществления ПЭГ присоединен посредством амидной связи, и, следовательно, некоторые применяемые производные ПЭГ будут соответствующим образом функционализированы. Например, в некоторых вариантах

осуществления ПЭГ11, который представляет собой О-(2-аминоэтил)-О'-(2-карбоксиэтил)-ундекаэтиленгликоль, имеет как амин, так и карбоновую кислоту для присоединения к пептиду настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ25 содержит дикарбоновую кислоту и 25 гликолевых фрагмента.

[00191] Другие подходящие полимерные фрагменты включают в себя полиаминокислоты, такие как полилизин, полиаспарагиновая кислота и полиглутаминовая кислота (см., например, Gombotz, et al. (1995), *Bioconjugate Chem.*, vol. 6: 332-351; Hudecz, et al. (1992), *Bioconjugate Chem.*, vol. 3, 49-57 и Tsukada, et al. (1984), *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 73, : 721-729. Полимерный фрагмент может быть прямоцепочечным или разветвленным. В некоторых вариантах осуществления он имеет молекулярную массу 500–40 000 Да, например, 500–10 000 Да, 1 000–5 000 Да, 10 000–20 000 Да или 20 000–40 000 Да.

[00192] В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина изобретения может содержать два или более таких полимерных фрагмента, и в этом случае общий молекулярный вес всех таких фрагментов обычно находится в пределах диапазонов, приведенных выше.

[00193] В некоторых вариантах осуществления полимерный фрагмент может быть соединен (ковалентной связью) с аминогруппой, карбоксильной или тиоловой группой боковой цепи аминокислоты. Некоторыми примерами могут быть тиоловые группы остатков Cys и эpsilon-аминогруппы остатков Lys, а также карбоксильные группы остатков Asp и Glu.

[00194] Специалистам хорошо известны подходящие методы, которые можно применять для проведения реакции связывания. Например, фрагмент PEG, содержащий метоксигруппу, может быть соединен с тиоловой группой Cys с помощью малеимидовой связи с применением реагентов, поставляемых на рынок Nektar Therapeutics AL. См. также WO 2008/101017 и ссылки, приведенные выше, для получения подробной информации о подходящих химических соединениях. Функционализированный малеимидом ПЭГ также может быть конъюгирован с сульфгидрильной группой боковой цепи остатка Cys.

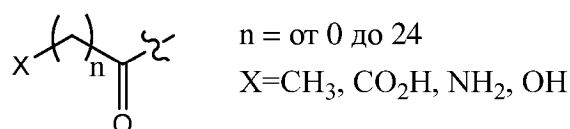
[00195] В контексте настоящего документа окисление дисульфидной связи может происходить в течение одного этапа или представлять собой двухэтапный процесс. В

контексте настоящего документа для одного этапа окисления во время сборки часто используют тритиловую группу, позволяющую снять защиту при расщеплении с последующим окислением раствора. При необходимости второй дисульфидной связи можно использовать естественное или селективное окисление. Для селективного окисления, требующего наличие ортогональных защитных групп, в качестве защитных групп для цистеина применяют Асм и тритил. Расщепление приводит к удалению одной защитной пары цистеина, что позволяет окислять эту пару. Затем проводится второй этап окислительного снятия защиты защищенной цистеином группы Асм. При нативном окислении тритиловую защитную группу применяют для всех цистеинов, что позволяет естественным образом сворачивать пептид.

[00196] Специалистам хорошо известны подходящие методы, которые можно применять для проведения этапа окисления.

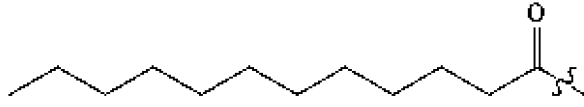
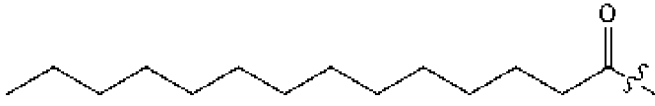
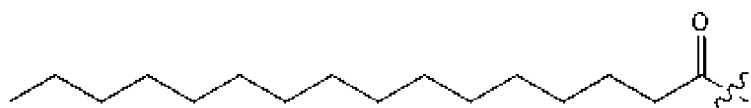
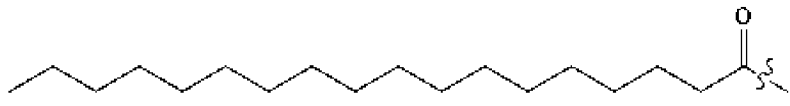
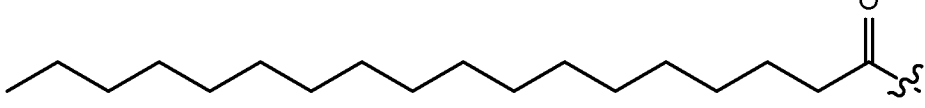
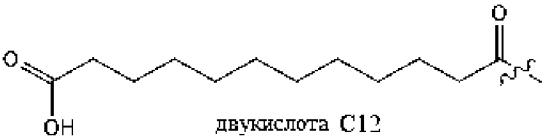
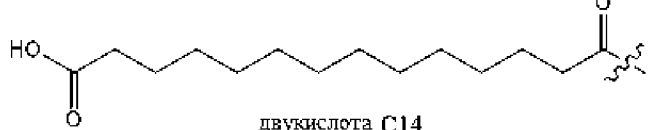
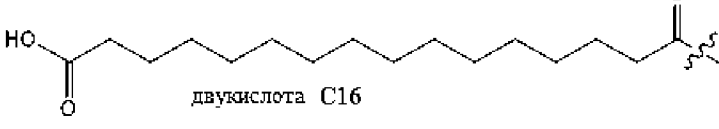
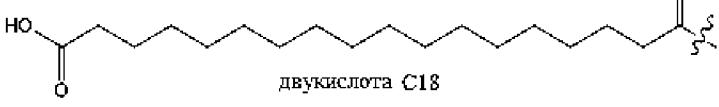
[00197] В конкретных вариантах осуществления аналог гепсидина настоящего изобретения содержит фрагмент, увеличивающий период полувыведения, который может быть выбран, помимо прочего, из следующих соединений: Ahx-Palm, ПЭГ2-Palm, ПЭГ11-Palm, изоGlu-Palm, dapa-Palm, изоGlu-лауриновая кислота, изоGlu-миристиновая кислота и изоGlu-изовалериановая кислота.

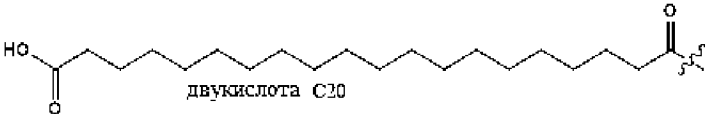
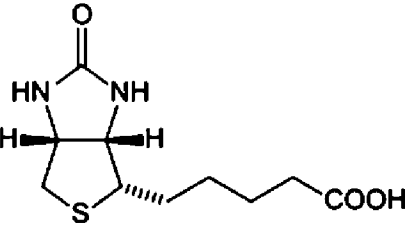
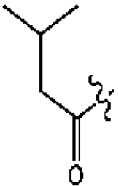
[00198] В конкретных вариантах осуществления аналог гепсидина содержит фрагмент, увеличивающий период полувыведения, имеющий структуру, приведенную ниже, где $n = \text{от } 0 \text{ до } 24$ или $n = \text{от } 14 \text{ до } 24$:



[00199] В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина настоящего изобретения содержит конъюгированный фрагмент, увеличивающий период полувыведения, приведенный в таблице 3.

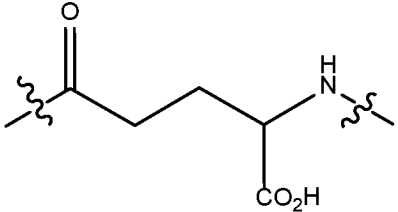
Таблица 3. Иллюстративные примеры фрагментов, увеличивающих период полувыведения

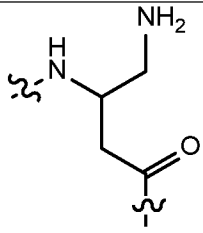
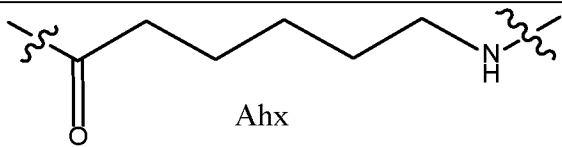
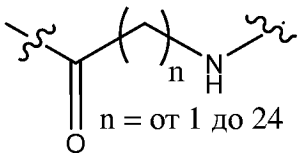
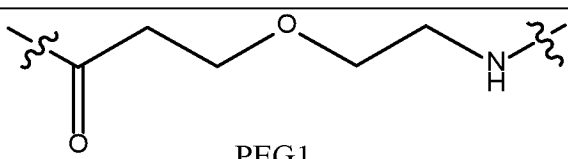
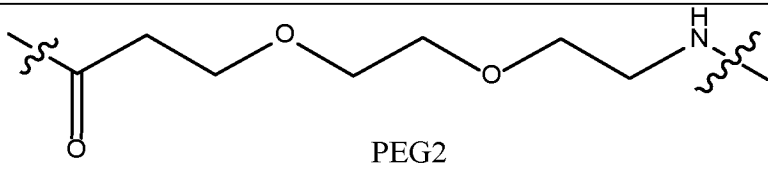
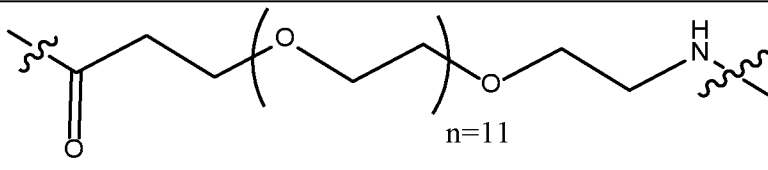
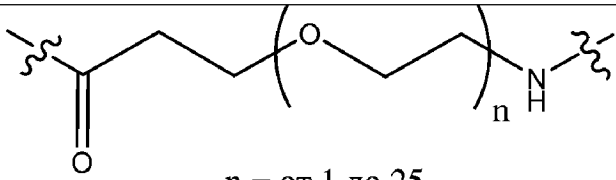
#	Конъюгаты
C1	 C12 (Лауриновая кислота)
C2	 C14 (Миристиновая кислота)
C3	 C16 (Пальмитиновая кислота)
C4	 C18 (Стеариновая кислота)
C5	 C20
C6	 двукислота C12
C7	 двукислота C14
C8	 двукислота C16
C9	 двукислота C18

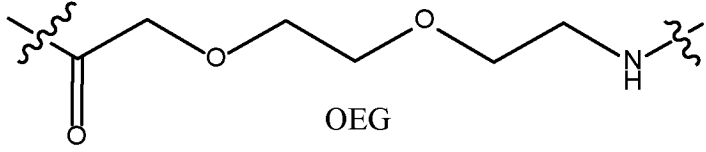
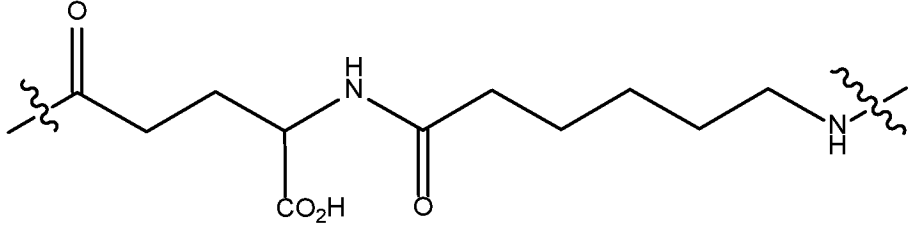
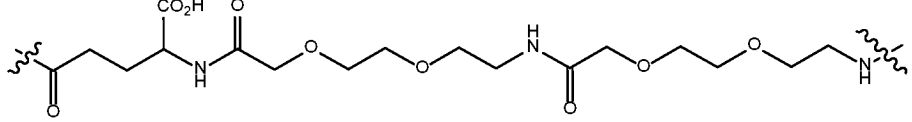
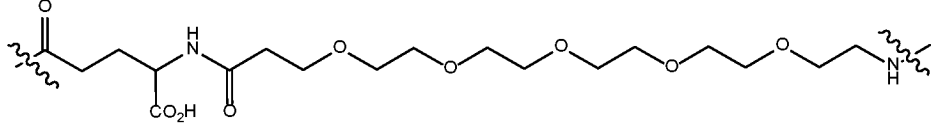
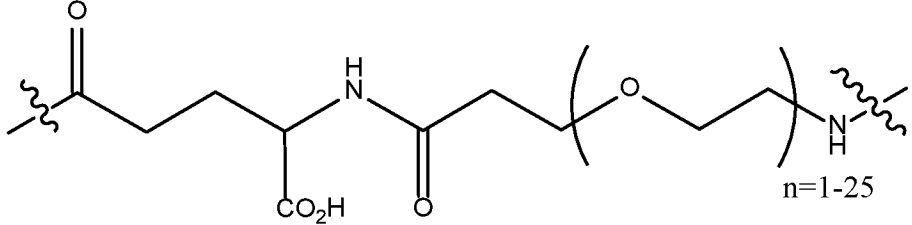
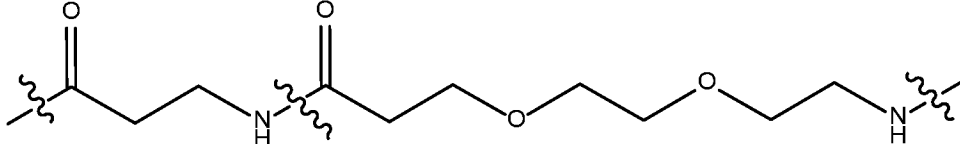
#	Конъюгаты
C10	 двукислота C20
C11	 Биотин
C12	 Изовалериановая кислота

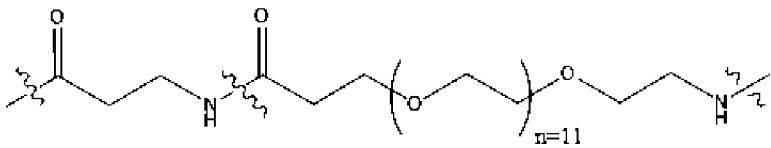
[00200] В некоторых вариантах осуществления фрагмент, увеличивающий период полувыведения, конъюгирован непосредственно с аналогом гепсидина, тогда как в других вариантах осуществления фрагмент, увеличивающий период полувыведения конъюгирован с пептидом аналога гепсидина посредством линкерного фрагмента, например, любого из тех, что изображены в таблицах 2 или 4.

Таблица 4. Иллюстративные примеры линкерных фрагментов

#	Линкерный фрагмент
L1	 ИзоGlu
L2	

#	Линкерный фрагмент
	 Dapa
L3	 Ahx
L4	Линкеры на основе липидов:  $n = \text{от } 1 \text{ до } 24$
L5	 PEG1
L6	 PEG2
L7	 $n=11$ ПЭГ11 (40 атомов)
L8	 $n = \text{от } 1 \text{ до } 25$ Линкеры на основе ПЭГ

#	Линкерный фрагмент
L9	 OEG
L10	 IsoGlu-Ahx
L11	 IsoGlu-OEG-OEG
L12	 IsoGlu-PEG5
L13	 IsoGlu-PEG_n
L14	 βAla-PEG2

#	Линкерный фрагмент
L15	 βAla-PEG11 (49 атомов)

[00201] В отношении линкерных структур, приведенных в таблице 4, ссылка на $n =$ от 1 до 24 или $n =$ от 1 до 25 или т. п. (например, в L4, L8 или L13) указывает на то, что n может быть любым целым числом в указанном диапазоне. Например, для L4, приведенного в таблице 4, n может составлять 1, 2, 3 и т. д., причем если $n = 5$, то L4 имеет структуру, приведенную в L3 (Ahx).

[00202] В конкретных вариантах осуществления аналог гепсидина настоящего изобретения содержит любой из линкерных фрагментов, представленных в таблице 4, и любой из фрагментов, увеличивающих период полувыведения, представленных в таблице 3, в том числе любую из следующих комбинаций, представленных в таблице 5.

Таблица 5. Иллюстративные комбинации линкеров и фрагментов, увеличивающих период полувыведения, в аналогах гепсидина

Линкер	Фрагмент, увеличивающий период полувыведения	Линкер	Фрагмент, увеличивающий период полувыведения	Линкер	Фрагмент, увеличивающий период полувыведения
L1	C1	L1	C2	L1	C3
L2	C1	L2	C2	L2	C3
L3	C1	L3	C2	L3	C3
L4	C1	L4	C2	L4	C3
L5	C1	L5	C2	L5	C3
L6	C1	L6	C2	L6	C3
L7	C1	L7	C2	L7	C3
L8	C1	L8	C2	L8	C3
L9	C1	L9	C2	L9	C3
L10	C1	L10	C2	L10	C3
L11	C1	L11	C2	L11	C3

Линкер	Фрагмент, увеличивающий период полувыведения	Линкер	Фрагмент, увеличивающий период полувыведения	Линкер	Фрагмент, увеличивающий период полувыведения
L12	C1	L12	C2	L12	C3
L13	C1	L13	C2	L13	C3
L14	C1	L14	C2	L14	C3
L15	C1	L15	C2	L15	C3

Линкер	Фрагмент, увеличивающий период полувыведения	Линкер	Фрагмент, увеличивающий период полувыведения	Линкер	Фрагмент, увеличивающий период полувыведения
L1	C4	L1	C5	L1	C6
L2	C4	L2	C5	L2	C6
L3	C4	L3	C5	L3	C6
L4	C4	L4	C5	L4	C6
L5	C4	L5	C5	L5	C6
L6	C4	L6	C5	L6	C6
L7	C4	L7	C5	L7	C6
L8	C4	L8	C5	L8	C6
L9	C4	L9	C5	L9	C6
L10	C4	L10	C5	L10	C6
L11	C4	L11	C5	L11	C6
L12	C4	L12	C5	L12	C6
L13	C4	L13	C5	L13	C6
L14	C4	L14	C5	L14	C6
L15	C4	L15	C5	L15	C6

Линкер	Фрагмент, увеличивающий период полувыведения	Линкер	Фрагмент, увеличивающий период полувыведения	Линкер	Фрагмент, увеличивающий период полувыведения
--------	---	--------	---	--------	---

Линкер	Фрагмент, увеличивающий период полувыведения	Линкер	Фрагмент, увеличивающий период полувыведения	Линкер	Фрагмент, увеличивающий период полувыведения
L1	C7	L1	C8	L1	C9
L2	C7	L2	C8	L2	C9
L3	C7	L3	C8	L3	C9
L4	C7	L4	C8	L4	C9
L5	C7	L5	C8	L5	C9
L6	C7	L6	C8	L6	C9
L7	C7	L7	C8	L7	C9
L8	C7	L8	C8	L8	C9
L9	C7	L9	C8	L9	C9
L10	C7	L10	C8	L10	C9
L11	C7	L11	C8	L11	C9
L12	C7	L12	C8	L12	C9
L13	C7	L13	C8	L13	C9
L14	C7	L14	C8	L14	C9
L15	C7	L15	C8	L15	C9

Линкер	Фрагмент, увеличивающий период полувыведения	Линкер	Фрагмент, увеличивающий период полувыведения	Линкер	Фрагмент, увеличивающий период полувыведения
L1	C10	L1	C11	L1	C12
L2	C10	L2	C11	L2	C12
L3	C10	L3	C11	L3	C12
L4	C10	L4	C11	L4	C12
L5	C10	L5	C11	L5	C12
L6	C10	L6	C11	L6	C12
L7	C10	L7	C11	L7	C12
L8	C10	L8	C11	L8	C12
L9	C10	L9	C11	L9	C12

Линкер	Фрагмент, увеличивающий период полувыведения		Линкер	Фрагмент, увеличивающий период полувыведения		Линкер	Фрагмент, увеличивающий период полувыведения
L10	C10		L10	C11		L10	C12
L11	C10		L11	C11		L11	C12
L12	C10		L12	C11		L12	C12
L13	C10		L13	C11		L13	C12
L14	C10		L14	C11		L14	C12
L15	C10		L15	C11		L15	C12

[00203] В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина содержит два или более линкеров. В конкретных вариантах осуществления два или более линкеров конкатамеризованы, т. е. связаны друг с другом. В схожих вариантах осуществления настоящее изобретение включает в себя полинуклеотиды, которые кодируют полипептид, имеющий пептидную последовательность, присутствующую в любом из описанных в настоящем документе аналогов гепсидина.

[00204] Кроме того, настоящее изобретение включает в себя векторы, например, экспрессионные векторы, содержащие полинуклеотид настоящего изобретения.

Способы лечения

[00205] Истинная полицитемия (PV) представляет собой хроническое прогрессирующее клональное заболевание, охватывающее три линии клеток, характеризующееся повышенной пролиферацией/накоплением миелоидных, эритроидных и мегакариоцитарных клеток и определяемое Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) как миелопролиферативное новообразование (Arber et al., Blood, 2016,127(20):2391-405). Диагноз определяется двумя критериями, первый из которых представляет собой увеличение массы эритроцитов, гиперклеточность по трем линиям клеток, обнаруживаемую в биоптате костного мозга, и наличие мутаций JAK2V617F или в 12 экзоне гена JAK2, а второй критерий включает полицитемию, подтверждение биопсией костного мозга и субнормальные уровни эритропоэтина в сыворотке (Arber et al., Blood, 2016,127(20):2391-405).

[00206] В ходе образования эритроцитов у людей с нормоцитемией эритропоэз регулируется эритропоэтином, который зависит от JAK2, однако в случае, когда JAK2 конститутивно активирован, эритропоэтиннезависимое образование эритроцитов приводит к полицитемии. Около 95% пациентов с PV имеют мутацию JAK2V617F (Rampal et al., *Blood*. 2014, 123(22):e123-33.). PV может прогрессировать до миелофиброза или подвергнуться лейкемической трансформации. Полицитемия у мужчин с PV характеризуется Hgb >16,5 г/дл или Hct >49%, а у женщин с PV — Hgb >16,0 г/дл или Hct >48%. Гематокрит выше 44% у пациентов с PV связан с резким увеличением числа перенесенных тромбоэмболических осложнений (Pearson et al., *Lancet*. 1978;2:1219-1221). Для подтверждения PV и исключения эссенциальной тромбоцитемии производится биопсия костного мозга, в котором обнаруживают гиперклеточность для данного возраста с ростом трех линий клеток.

[00207] По оценкам, в США 148 000 человек живут с PV, медианный возраст которых при постановке диагноза составляет 61 год (Stein et al., *J Clin Oncol*. 2015 Nov 20;33(33):3953-60). Симптомы полицитемии, связанные с повышенной вязкостью крови, включают в себя усталость, боль в костях, головные боли, головокружение, нарушения зрения, атипичные боли в груди, зуд, эритромелалгию и парестезию (Tefferi et al., *Blood Cancer J*. 2018, 8(1):3). Клинические особенности включают в себя спленомегалию, тромботические и геморрагические осложнения, а также риск лейкемической трансформации.

[00208] PV подразделяют на две категории риска, которые определяют последующую схему лечения: высокий риск (возраст ≥ 60 лет и наличие тромбоза в анамнезе) и низкий риск (возраст <60 лет и отсутствие тромбоза в анамнезе) (Tefferi & Barbui, *Am J Hematol*. 2017 Jan;92(1):94-108). В США может применяться альтернативная классификация: высокий риск (возраст ≥ 60 лет) и низкий риск (возраст <60 лет). Всем пациентам с PV проводят терапевтическое кровопускание для снижения гематокрита и назначают ежедневный однократный прием аспирина (81 мг) с целью профилактики тромбогеморрагических осложнений. До внедрения терапевтического кровопускания медиана выживаемости при нелеченном PV составляла менее 2 лет, а смерть была связана с тромботическими осложнениями (Tefferi et al., 2018). При использовании современных способов лечения медиана выживаемости с момента постановки диагноза у пациентов моложе 60 лет составляет 24 года по сравнению с 14 годами у пациентов в возрасте старше 60 лет. Целевой гематокрит при терапевтическом кровопускании

составляет <45% для мужчин и <42% для женщин, а во время беременности — <36% (Streiff et al., Blood. 2002, 99 (4): 1144-9), что соответствует уровням Hgb 15, 14 и 12 г/дл, соответственно. Целью терапевтического кровопускания является создание хронического состояния дефицита железа, тем самым уменьшая образование эритроцитов. Более того, при недостатке железа эритроциты из-за уменьшенных размеров снижают вязкость крови по сравнению с кровью при нормоцитемии. К счастью, после проведенного анализа физической нагрузки подтвердилось, что пациенты с PV в состоянии хронического дефицита железа не испытывают недостатка кислорода, связанного с дефицитом железа, ожидаемого у пациентов с нормоцитемией (Rector et al., Medicine (Baltimore). 1982 Nov;61(6):382-9).

[00209] Циторедуктивная терапия применяется для пациентов с высоким риском и для тех пациентов с низким риском, которые не переносят кровопускание, имеют прогрессирующую спленомегалию, или количество тромбоцитов, составляющее $>1\,500 \times 10^9/\text{л}$ или прогрессирующий лейкоцитоз. Циторедуктивные средства включают в себя, помимо прочего, гидроксимочевину, интерферон альфа, руксолитиниб (Jakafi®) и бусульфан. В США гидроксимочевина является препаратом первой линии для лечения пациентов с PV старше 40 лет, поскольку она эффективно усиливает миелосупрессию и снижает риск тромбоза по сравнению с применением только кровопускания. Однако опасения в связи с отдаленным риском вторичной лейкемии, связанным с применением гидроксимочевины, оправданы. После медианного наблюдения в течение более 8 лет исследовательская группа Polycythemia Vera Study Group сообщила о том, что у 5,4% наблюдаемых пациентов с PV после приема гидроксимочевины развилась лейкемия, по сравнению с 1,5% пациентов, которым проводилось только кровопускание (Fruchtman et al., Semin Hematol. 1997, 34:17-23). Пациентов с непереносимостью или резистентностью к гидроксимочевине можно лечить пегилированным IFN- α или бусульфаном. IFN- α предпочтителен у пациентов моложе 65 лет, а бусульфан — у пожилых людей.

[00210] Приблизительно один из четырех пациентов с PV считается неконтролируемым, поскольку у них наблюдается неадекватный ответ на гидроксимочевину или ее непереносимость. Jakafi® (руксолитиниб) представляет собой ингибитор JAK1/JAK2, одобренный Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (Food and Drug Administration) для пациентов с PV, резистентных к гидроксимочевине или не переносящих ее. Препарат одобрен на основании результатов исследования фазы 3,

названного RESPONSE-Randomized, открытого многоцентрового исследования фазы 3 эффективности и безопасности у субъектов с истинной полицитемией, резистентных к гидроксимочевине или не переносящих ее: таблетки ингибитора JAK INC424 в сравнении с оптимальным доступным лечением (BAT). В исследовании оценивались пациенты с PV, нуждающиеся в кровопускании, и спленомегалией, которые не переносили или оказались резистентными к гидроксимочевине и были рандомизированы на получение руксолитиниба (n=110) или оптимального доступного препарата (n=112). Составная первичная конечная точка включала в себя контроль гематокрита ($<45\%$) и уменьшение селезенки (уменьшение на $\geq 35\%$) на 32 неделе. После 32 недели пациенты, которые были рандомизированы на оптимальную доступную терапию, могли перейти на руксолитиниб. Через 32 недели 77% пациентов, рандомизированных на получение руксолитиниба, выполнили по меньшей мере 1 компонент первичной конечной точки, но только 1% пациентов, получавших BAT, успешно выполнили первичную конечную точку. У большинства (91%) пациентов, получавших лечение руксолитинибом и успешно выполнивших первичную конечную точку, подтвержденный ответ был получен на 48 неделе, а вероятность сохранения первичного ответа в течение 1 года составила 94%. Частота тромбозмболических событий оказалась ниже в группе руксолитиниба, в которой только 1 событие (тромбоз воротной вены) было зарегистрировано на 32 неделе, по сравнению с 6 событиями среди пациентов, получавших BAT. Участники исследования RESPONSE пришли к выводу, что у пациентов с PV, показавших неадекватный ответ на гидроксимочевину или имевших непереносимость к нему, руксолитиниб превосходил BAT по контролю гематокрита без кровопусканий, нормализации количества клеток крови, уменьшению объема селезенки и улучшению симптомов, связанных с PV, в том числе зуда, усталости и ночной потливости.

[00211] Пациентам в США проводят приблизительно 8 кровопусканий в год, и эта процедура вызывает стресс, беспокойство и неудобства (Voccia et al., Blood, 2017, 130(Suppl 1), 5271). На процедуру кровопускания тратят значительное количество времени — приблизительно половину рабочего дня на одну процедуру. Более того, имеет место большое количество окислительно-восстановительных/метаболических циклов (нуждается в дополнительном изучении), поэтому если конечной целью терапии кровопусканиями при истинной полицитемии является достижение состояния

хронического дефицита железа, ограничивающего эритропоэз, то теоретически этого можно достичь с помощью гепсидина/миметиков гепсидина.

[00212] Гепсидин, 25-аминокислотный пептид, регулирует системный гомеостаз железа и вырабатывается печенью в ответ на концентрацию железа в плазме и запасы железа. Гепсидин ингибирует клеточный экспортер железа ферропортин (FPN-1), который экспрессируется на поверхности клеток, участвующих в поглощении, переработке и хранении железа. Гепсидин модулирует системное ограничение железа, а введение экзогенного миметика гепсидина снижает концентрации Hgb и уменьшает спленомегалию в мышинной модели PV (Casu et al, Blood. 2016;128(2):265-276).

[00213] При конститутивной активации JAK2 запускается эритропоэтиннезависимое образование эритроцитов, что приводит к полицитемии. Стратегия по предотвращению эффекта мутировавшего Jak2 заключается в том, чтобы вызвать ограничение железа с помощью гепсидина или пептидов гепсидиновых миметиков. Низкий уровень железа ингибирует сигнализацию эритропоэтина в точке по ходу транскрипции Jak2, тем самым обеспечивая блокирующий сигнал. При введении пептидов гепсидиновых миметиков трансгенным мышам, которые экспрессируют человеческий ген Jak2, несущий мутацию, вызывающую полицитемию, увеличенное образование эритроцитов и высокий гематокрит, характерные для истинной полицитемии, возвращаются к норме. Ссылка (Casu et al Blood. 2016;128(2):265-276).

[00214] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способы лечения субъекта, страдающего заболеванием или расстройством, связанным с истинной полицитемией, причем способ включает в себя введение субъекту аналога гепсидина настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина вводят субъекту в составе композиции (например, фармацевтической композиции). Предполагается, что упоминание в настоящем документе аналога гепсидина включает в себя фармацевтически приемлемые соли таких аналогов гепсидина.

[00215] В одном варианте осуществления предложен способ лечения субъекта, страдающего заболеванием или расстройством, характеризующимся повышенной активностью или экспрессией ферропортина, причем способ включает в себя введение субъекту аналога гепсидина или композиции настоящего изобретения в количестве,

достаточном для (частичного или полного) связывания с ферропортином и его подавления у субъекта. В одном варианте осуществления предложен способ лечения субъекта, страдающего заболеванием или расстройством, характеризующимся нарушением регуляции метаболизма железа, причем способ включает в себя введение субъекту аналога гепсидина или композиции настоящего изобретения.

[00216] В некоторых вариантах осуществления способы настоящего изобретения включают в себя предоставление аналога гепсидина или композиции настоящего изобретения нуждающемуся в этом субъекту. В конкретных вариантах осуществления у нуждающегося в этом субъекта диагностировано или определен риск развития заболевания или расстройства, характеризующегося нарушением регуляции уровней железа (например, заболеваний или расстройств метаболизма железа, заболеваний или расстройств, связанных с перегрузкой железом, и заболеваний или расстройств, связанных с аномальной активностью или экспрессией гепсидина). В конкретных вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее (например, человека).

[00217] В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой истинную полицитемию. В некоторых вариантах осуществления истинная полицитемия представляет собой истинную полицитемию, требующую проведения кровопусканий. В некоторых вариантах осуществления истинная полицитемия представляет собой истинную полицитемию, требующую проведения кровопусканий, у пациента с низким риском. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой пациента с высоким риском истинной полицитемии. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой пациента с низким риском истинной полицитемии. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой пациента с симптомами истинной полицитемии, требующей проведения кровопусканий. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой пациента с низким риском истинной полицитемии, требующей проведения кровопусканий. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой пациента с высоким риском истинной полицитемии, требующей проведения кровопусканий. В некоторых вариантах осуществления субъекту поставлен диагноз истинной полицитемии и проведено по меньшей мере три кровопускания для достижения гематокрита $\leq 45\%$ в течение 24 недель до введения субъекту

фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее, например, человека.

[00218] Соответственно, в одном варианте осуществления предложен способ лечения субъекта с диагнозом истинной полицитемии или страдающего истинной полицитемией, причем способ включает в себя введение субъекту аналога гепсидина или композиции, раскрытой в настоящем документе, в количестве, эффективном для лечения истинной полицитемии. В некоторых вариантах осуществления истинная полицитемия представляет собой истинную полицитемию, требующую проведения кровопусканий. В некоторых вариантах осуществления истинная полицитемия представляет собой истинную полицитемию, требующую проведения кровопусканий, у пациента с низким риском. В некоторых вариантах осуществления истинная полицитемия представляет собой истинную полицитемию, требующую проведения кровопусканий, у пациента с высоким риском. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой пациента с низким риском истинной полицитемии. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой пациента с высоким риском истинной полицитемии. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой пациента с симптомами истинной полицитемии, требующей проведения кровопусканий. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой пациента с низким риском истинной полицитемии, требующей проведения кровопусканий. В некоторых вариантах осуществления субъекту поставлен диагноз истинной полицитемии и проведено по меньшей мере три кровопускания для достижения гематокрита $\leq 45\%$ в течение 24 недель до введения субъекту фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее, например, человека.

[00219] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложен способ лечения истинной полицитемии у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающий в себя введение субъекту эффективного количества аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли, пептида или композиции, раскрытых в настоящем документе, например, пептида, имеющего структуру SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46; SEQ ID NO:47 или SEQ ID NO:48. В некоторых вариантах осуществления истинная полицитемия представляет собой истинную полицитемию, требующую проведения кровопусканий. В некоторых вариантах осуществления истинная полицитемия представляет собой истинную полицитемию, требующую

проведения кровопусканий, у пациента с низким риском или высоким риском. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой пациента с низким риском истинной полицитемии. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой пациента с высоким риском истинной полицитемии. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой пациента с симптомами истинной полицитемии, требующей проведения кровопусканий. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой пациента с низким риском истинной полицитемии, требующей проведения кровопусканий. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой пациента с высоким риском истинной полицитемии, требующей проведения кровопусканий. В некоторых вариантах осуществления субъекту поставлен диагноз истинной полицитемии и проведено по меньшей мере три кровопускания для достижения гематокрита $\leq 45\%$ в течение 24 недель до введения субъекту фармацевтической композиции.

[00220] В конкретных вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в настоящем документе, эффективное количество составляет от около 5 мг до около 200 мг или от около 10 мг до около 100 мг, например, около 10 мг, около 15 мг, около 20 мг, около 25 мг, около 30 мг, около 40 мг, около 50 мг, около 60 мг, около 70 мг, около 80 мг, около 100 мг или около 120 мг.

[00221] В одном варианте осуществления в изобретении предложен способ лечения субъекта-человека с истинной полицитемией, требующей проведения кровопусканий, включающий в себя подкожное введение субъекту эффективного количества аналога гепсидина, раскрытого в настоящем документе, например, пептида, имеющего структуру SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46; SEQ ID NO:47 или SEQ ID NO:48. В конкретных вариантах осуществления эффективное количество составляет от около 10 мг до около 100 мг, например, около 10 мг, около 15 мг, около 20 мг, около 25 мг, около 30 мг, около 40 мг, около 50 мг, около 60 мг, около 70 мг, около 80 мг или около 100 мг, а аналог гепсидина вводят субъекту примерно два раза в неделю, примерно один раз в неделю, примерно один раз в две недели или примерно один раз в месяц. В конкретных вариантах осуществления субъекту вводят около 15 мг, около 20 мг, около 30 мг, около 40 мг, около 50 мг, около 60 мг, около 70 мг или около 80 мг аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли примерно один раз в неделю. В конкретных вариантах осуществления, когда аналог гепсидина вводят женщине, может быть введено уменьшенное количество аналога гепсидина, например,

от около 10 мг до около 60 мг, например, около 10 мг, около 15 мг, около 20 мг, около 25 мг, около 30 мг, около 40 мг, около 50 мг или около 60 мг. В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль вводят примерно один раз в две недели или примерно один раз в месяц. В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль вводят многократно в течение определенного периода времени, например, периода времени, составляющего не менее шести месяцев, не менее или около одного года, не менее или около двух лет, не менее или около пяти лет или в течение всей жизни субъекта.

[00222] В конкретных вариантах осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль, или пептид вводят в составе композиции (например, фармацевтической композиции), и в некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль, или пептид (или композицию) вводят путем подкожной инъекции. В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль, или пептид (или композицию) вводят примерно еженедельно в течение определенного периода времени, например, до тех пор, пока существует необходимость. В некоторых вариантах осуществления аналог или пептид гепсидина (или композицию) вводят примерно каждые трое суток, примерно два раза в неделю, примерно каждые четыре суток, примерно каждые пять суток, примерно еженедельно, примерно один раз в две недели, примерно один раз в месяц, примерно один раз в шесть недель, примерно один раз в восемь недель, примерно один раз в два месяца или примерно один раз в три месяца. В конкретных вариантах осуществления его вводят примерно один раз в неделю или примерно один раз в две недели. В конкретных вариантах осуществления его вводят примерно один раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления его вводят примерно один раз в две недели, примерно один раз в месяц или примерно один раз в два месяца.

[00223] В различных вариантах осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, эффективное количество аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли представляет собой количество, достаточное для достижения концентрации аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли в плазме или сыворотке крови субъекта от около 5 нг/мл до около 3 500 нг/мл, от около 100 нг/мл до около 3 000 нг/мл, от около 5 нг/мл до около 900 нг/мл или от около

5 нг/мл до около 250 нг/мл, или от около 20 нг/мл до 150 нг/мл. Эффективное количество оптимально поддерживает у пациентов желаемый диапазон значений гематокрита, определенных в настоящем документе.

[00224] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложен способ лечения PV у субъекта, включающий в себя предоставление субъекту эффективного количества аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли, причем субъект получает такое количество аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли, чтобы достичь концентрации аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли в плазме или сыворотке крови субъекта от около 2 нг/мл до около 3 500 нг/мл, от около 5 нг/мл до около 3 500 нг/мл, от около 100 нг/мл до около 3 000 нг/мл, от около 5 нг/мл до около 900 нг/мл, от около 5 нг/мл до около 250 нг/мл или от около 20 нг/мл до 150 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления требуемая концентрация в плазме или сыворотке крови составляет по меньшей мере около 25 нг/мл, по меньшей мере около 50 нг/мл, по меньшей мере около 100 нг/мл, по меньшей мере около 200 нг/мл, по меньшей мере около 500 нг/мл, по меньшей мере около 1 000 нг/мл, по меньшей мере около 1 500 нг/мл, по меньшей мере около 2 000 нг/мл, по меньшей мере около 2 500 нг/мл или по меньшей мере около 3 000 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления требуемая концентрация в плазме или сыворотке крови составляет от около 200 нг/мл до около 3 200 нг/мл или от около 1 000 нг/мл до около 3 200 нг/мл, или от около 1 000 нг/мл до около 2 000 нг/мл, или от около 2 000 нг/мл до около 3 000 нг/мл, например, для соединения А. В некоторых вариантах осуществления требуемая концентрация в плазме или сыворотке крови составляет по меньшей мере 4 нг/мл, по меньшей мере 5 нг/мл, по меньшей мере 8 нг/мл, по меньшей мере 10 нг/мл, по меньшей мере 12 нг/мл/мл, по меньшей мере 15 нг/мл, по меньшей мере 17 нг/мл или по меньшей мере 20 нг/мл, например, для соединения А. В конкретных вариантах осуществления требуемая концентрация в плазме или сыворотке крови составляет по меньшей мере около 4 нг/мл или по меньшей мере около 17 нг/мл, например, для соединения А. В конкретных вариантах осуществления этот уровень в плазме или сыворотке крови достигается после одного введения и поддерживается до следующего введения аналога гепсидина, например, соединения А или соединения В. В конкретных вариантах осуществления этот уровень в плазме или сыворотке крови достигается и поддерживается в течение по меньшей мере четырех суток, по меньшей мере пяти суток, по меньшей мере шести суток или по

меньшей мере одной недели после введения аналога гепсидина, например, соединения А или соединения В. В некоторых вариантах осуществления требуемая концентрация в плазме или сыворотке крови составляет по меньшей мере около 20 нг/мл, по меньшей мере около 30 нг/мл, по меньшей мере около 50 нг/мл, по меньшей мере около 100 нг/мл, по меньшей мере около 150 нг/мл, по меньшей мере около 200 нг/мл, по меньшей мере около 500 нг/мл, по меньшей мере около 1 000 нг/мл, по меньшей мере около 1 500 нг/мл, по меньшей мере около 2 000 нг/мл, по меньшей мере около 2 500 нг/мл или по меньшей мере около 3 000 нг/мл, например, для соединения А. В некоторых вариантах осуществления требуемая концентрация в плазме или сыворотке крови составляет по меньшей мере около 50 нг/мл в течение 20–48 часов после введения, по меньшей мере около 100 нг/мл в течение 20–48 часов после введения, по меньшей мере около 250 нг/мл в течение 20–48 часов после введения, по меньшей мере около 400 нг/мл в течение 20–48 часов после введения, по меньшей мере около 500 нг/мл в течение 20–48 часов после введения, по меньшей мере около 800 нг/мл в течение 20–48 часов после введения или по меньшей мере около 1 000 нг/мл в течение 20–48 часов после введения, например, для соединения А. В некоторых вариантах осуществления требуемая концентрация в плазме или сыворотке крови составляет от около 25 нг/мл до около 1 000 нг/мл в течение 20–48 часов после введения, от около 100 нг/мл до около 1 000 нг/мл в течение 20–48 часов после введения, от около 200 нг/мл до около 1 000 нг/мл в течение 20–48 часов после введения, от около 400 нг/мл до около 850 нг/мл в течение 20–48 часов после введения, например, для соединения А. В некоторых вариантах осуществления требуемая концентрация в плазме или сыворотке крови составляет от около 25 нг/мл до около 125 нг/мл или от около 50 нг/мл до около 125 нг/мл, например, для соединения В. В некоторых вариантах осуществления требуемая концентрация в плазме или сыворотке крови составляет по меньшей мере около 25 нг/мл, по меньшей мере около 50 нг/мл или по меньшей мере около 100 нг/мл, например, для соединения В. В некоторых вариантах осуществления эта концентрация в плазме или сыворотке крови является максимальной концентрацией в плазме или сыворотке крови после введения аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления эта концентрация в плазме или сыворотке крови поддерживается в течение определенного периода времени после введения аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли, например, в течение периода времени, составляющего не менее двух суток, не менее трех суток, не менее четырех суток, не менее пяти суток, не менее

шести суток, не менее одной недели, не менее 9 суток, не менее 12 суток или не менее двух недель. В некоторых вариантах осуществления достигнутая концентрация в плазме или сыворотке крови составляет от около 200 нг/мл до около 3 200 нг/мл или от около 1 000 нг/мл до около 3 200 нг/мл, или от около 1 000 нг/мл до около 2 000 нг/мл, или от около 2 000 нг/мл до около 3 000 нг/мл, например, для соединения А, например, в течение около 4 часов, около 8 часов, около 12 часов, около 24 часов или около 48 часов. В некоторых вариантах осуществления достигнутая концентрация в плазме или сыворотке крови составляет по меньшей мере около 200 нг/мл, по меньшей мере около 500 нг/мл, по меньшей мере около 1 000 нг/мл, по меньшей мере около 1 500 нг/мл, по меньшей мере около 2 000 нг/мл, по меньшей мере около 2 500 нг/мл или по меньшей мере около 3 000 нг/мл, например, для соединения А, в течение по меньшей мере около 4 часов, около 8 часов, около 12 часов, около 24 часов, около 48 часов или около 72 часов. В некоторых вариантах осуществления достигнутая концентрация в плазме или сыворотке крови составляет от около 25 нг/мл до около 125 нг/мл или от около 50 нг/мл до около 125 нг/мл, например, для соединения В, например, в течение около 4 часов, около 8 часов, около 12 часов, около 24 часов или около 48 часов. В некоторых вариантах осуществления достигнутая концентрация в плазме или сыворотке крови составляет по меньшей мере около 25 нг/мл, по меньшей мере около 50 нг/мл или по меньшей мере около 100 нг/мл, например, для соединения В, например, в течение около 4 часов, около 8 часов, около 12 часов, около 24 часов или около 48 часов. В конкретных вариантах осуществления. В конкретных вариантах осуществления аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль вводят подкожно. В конкретных вариантах осуществления у субъекта истинная полицитемия, требующая проведения кровопусканий. В конкретных вариантах осуществления субъекту вводят от около 10 мг до около 100 мг, например, около 10 мг, около 15 мг, около 20 мг, около 25 мг, около 30 мг, около 40 мг, около 50 мг, около 60 мг, около 70 мг, около 80 мг или около 100 мг аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли, и аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту примерно два раза в неделю, примерно один раз в неделю, примерно один раз в две недели или примерно один раз в месяц. В конкретных вариантах осуществления субъекту вводят около 15 мг, около 20 мг, около 30 мг, около 40 мг, около 50 мг, около 60 мг, около 70 мг или около 80 мг аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли примерно один раз в неделю или примерно один раз в две недели. В конкретных вариантах осуществления субъекту вводят около 15 мг,

около 20 мг, около 30 мг, около 40 мг, около 50 мг, около 60 мг, около 70 мг или около 80 мг аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли примерно один раз в неделю.

[00225] В некоторых вариантах осуществления субъект получает аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль, раскрытые в настоящем документе, например, аналог гепсидина, имеющий структуру SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46; SEQ ID NO:47 или SEQ ID NO:48, или соединение А или соединение В, в комбинации с циторедуктивной терапией, например, гидроксимочевинной, интерфероном или руксолитинибом. В конкретных вариантах осуществления, когда аналог гепсидина применяют в комбинации с циторедуктивной терапией, может быть введено уменьшенное количество аналога гепсидина, например, от около 10 мг до около 60 мг, например, около 10 мг, около 15 мг, около 20 мг, около 25 мг, около 30 мг, около 40 мг, около 50 мг или около 60 мг.

[00226] Любой из способов, раскрытых в настоящем документе, может дополнительно включать в себя этап определения гематокрита субъекта после введения аналога гепсидина. Как показано на фигуре 7, уровни гематокрита можно поддерживать на желаемом уровне путем титрования количества аналога гепсидина, вводимого пациенту. Таким образом, способы можно применять для определения и введения концентрации/дозы аналога гепсидина, которые оптимально подходят для поддержания гематокрита ниже целевого уровня. В некоторых вариантах осуществления целевой уровень для человека составляет 45% или ниже, например, как измерено в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления целевой уровень для мужчин составляет 45% или ниже (например, от около 37% до около 45%); в некоторых случаях целевой пороговый уровень для женщин (например, небеременных) составляет 43% или ниже, или 42% или ниже (например, от около 35% до около 42% или 43%); и в некоторых случаях целевой уровень для беременных женщин составляет 36% или ниже (например, от около 30% до около 36%). В некоторых вариантах осуществления способы применяют на практике для достижения гематокрита пациента ниже 45% (или до определенного уровня, например, 42%) на основе понимания взаимосвязи между дозой аналога гепсидина и реакцией гематокрита (т. е. снижением гематокрита). Таким образом, в изобретении предложены режимы дозирования, которые могут максимально увеличить время, в течение которого гематокрит пациентов находится ниже желаемого целевого уровня, и минимизировать колебания выше этого целевого уровня.

[00227] В конкретных вариантах осуществления гематокрит субъекта определяют в период времени от около одних суток до около 7 суток после введения аналога гепсидина. В конкретных вариантах осуществления если установленный гематокрит субъекта превышает 45%, то при следующем запланированном лечении субъекту вводят более высокую дозу аналога гепсидина по сравнению с дозой, введенной непосредственно перед определением гематокрита. В конкретных вариантах осуществления если установленный гематокрит субъекта превышает желаемый целевой уровень для его пола и состояния беременности, то при следующем запланированном лечении субъекту вводят более высокую дозу аналога гепсидина по сравнению с дозой, введенной непосредственно перед определением гематокрита. В конкретных вариантах осуществления если установленный гематокрит субъекта ниже порогового уровня, например, ниже 42%, ниже 40%, ниже 37,5%, ниже 36% или ниже 35%, то при следующем запланированном лечении субъекту вводят меньшую дозу аналога гепсидина по сравнению с дозой, введенной непосредственно перед определением гематокрита. В некоторых вариантах осуществления если установленный гематокрит субъекта находится в допустимом диапазоне, например, между 35% и 42%, между 35% и 45%, между 37,5% и 45%, между 40% и 45% или между 40% и 44%, то при следующем запланированном лечении субъекту вводят такую же дозу аналога гепсидина по сравнению с дозой, введенной непосредственно перед определением гематокрита. Допустимый диапазон может варьироваться в зависимости от пола и состояния беременности субъекта. В некоторых вариантах осуществления допустимый диапазон для мужчины составляет от около 37% до около 45%, допустимый диапазон для небеременной женщины составляет от около 35% до около 42% или 43%, а допустимый диапазон для беременной женщины составляет от около 30% до около 36%.

[00228] В конкретных вариантах осуществления способ включает в себя определение уровня гематокрита субъекта несколько раз в течение курса лечения для контроля эффективности вводимой дозы и изменения дозы по мере необходимости для поддержания гематокрита субъекта в целевом диапазоне, например, от 30% до 35%, от 35% до 41%, от 35% до 45%, от 37,5% до 45%, от 40% до 45% или от 40% до 43%. В некоторых вариантах осуществления уровень гематокрита субъекта определяют примерно каждые 2 недели, примерно каждые три недели, примерно каждые четыре недели или примерно каждые восемь недель в течение курса лечения. В некоторых

вариантах осуществления его определяют примерно каждые четыре недели в течение курса лечения. В конкретных вариантах осуществления целевой диапазон является допустимым диапазоном для пола и состояния беременности субъекта. В некоторых вариантах осуществления любой из способов включает в себя поддержание или корректировку количества аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли, вводимой субъекту, причем количество увеличивают, если установленный гематокрит субъекта больше 45%, при этом количество уменьшают, если установленный гематокрит субъекта меньше 37,5% или 40%, и поддерживают количество, если установленный гематокрит субъекта составляет от 37,5% до 45% или от 40% до 44%.

[00229] В одном варианте осуществления в изобретении предложен способ лечения PV, включающий в себя подкожное введение пациенту с диагнозом PV аналога гепсидина, например, соединения А, в дозе от около 10 мг до около 80 мг, примерно один раз в неделю в течение периода времени, составляющего по меньшей мере семь недель, причем в результате применения способа субъект не нуждается или ему не проводятся терапевтические кровопускания в течение семи недель. В конкретных вариантах осуществления доза составляет около 10 мг, около 15 мг, около 20 мг, около 25 мг, около 30 мг, около 40 мг, около 50 мг, около 60 мг, около 70 мг или около 80 мг. В конкретных вариантах осуществления субъекту проводили одно или более терапевтических кровопусканий до лечения аналогом гепсидина. В конкретных вариантах осуществления субъекту проводили одно или более терапевтических кровопусканий в течение восьми недель до лечения аналогом гепсидина. В конкретных вариантах осуществления субъект является мужчиной, и его гематокрит поддерживается на уровне <45% в течение по меньшей мере семи недель. В конкретных вариантах осуществления субъект является небеременной женщиной, и ее гематокрит поддерживается на уровне <42% или <43% в течение по меньшей мере семи недель. В конкретных вариантах осуществления субъект является беременной женщиной, и ее гематокрит поддерживается на уровне <36% в течение по меньшей мере семи недель. В конкретных вариантах осуществления уровень гематокрита поддерживается в течение по меньшей мере восьми недель, по меньшей мере 12 недель, по меньшей мере 16 недель, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере одного года или по меньшей мере двух лет после первого введения аналога гепсидина и во время лечения.

[00230] В одном варианте осуществления в изобретении предложен способ лечения PV, включающий в себя подкожное введение пациенту с диагнозом PV аналога гепсидина, например, соединения А, в дозе от около 10 мг до около 80 мг, примерно один раз в неделю в течение периода времени, составляющего по меньшей мере семь недель, причем в результате применения способа субъект не нуждается или ему не проводятся терапевтические кровопускания в течение семи недель. В конкретных вариантах осуществления субъекту проводили одно или более терапевтических кровопусканий до лечения аналогом гепсидина. В конкретных вариантах осуществления субъекту проводили одно или более терапевтических кровопусканий в течение восьми недель до лечения аналогом гепсидина. В конкретных вариантах осуществления уровень гематокрита субъекта измеряют один или более раз в течение семи недель, и следующую еженедельную дозу увеличивают, если уровень гематокрита субъекта выше допустимого диапазона, или уменьшают, если уровень гематокрита субъекта ниже допустимого диапазона. В конкретных вариантах осуществления субъект является мужчиной, и допустимый диапазон составляет от около 37% до около 45%. В конкретных вариантах осуществления увеличенная или уменьшенная доза также составляют от около 10 мг до около 80 мг. В некоторых вариантах осуществления дозу увеличивают или уменьшают примерно на 5 мг, примерно на 10 мг, примерно на 15 мг или примерно на 20 мг. В конкретных вариантах осуществления доза составляет около 10 мг, около 15 мг, около 20 мг, около 25 мг, около 30 мг, около 40 мг, около 50 мг, около 60 мг, около 70 мг или около 80 мг. В одном варианте осуществления субъект является небеременной женщиной, и допустимый диапазон составляет от около 35% до около 43%. В одном варианте осуществления субъект является беременной женщиной, и допустимый диапазон составляет от около 30% до около 36%. В конкретных вариантах осуществления субъект не нуждается или ему не проводятся кровопускания в течение по меньшей мере восьми недель, по меньшей мере 12 недель, по меньшей мере 16 недель, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере одного года или по меньшей мере двух лет после первого введения аналога гепсидина и во время лечения. В конкретных вариантах осуществления лечение продолжается по меньшей мере восемь недель, по меньшей мере 12 недель, по меньшей мере 16 недель, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере один год или по меньшей мере два года.

[00231] В различных вариантах осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, способ включает в себя многократное введение эффективного количества

аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли в течение определенного периода времени, например, в котором аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту примерно один раз в неделю или примерно два раза в неделю в течение определенного периода времени. Эффективное количество может варьироваться от одного введения к другому или оставаться неизменным. Период времени может варьироваться и составлять, например, от одной недели до 10 лет, от одного месяца до 10 лет, от одного месяца до пяти лет, от одного месяца до двух лет или от четырех месяцев до одного года. В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина выбран из группы, состоящей из:

(a) изовалериановой кислоты-DTHFPCIKF(K(PEG3-Palm))PRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:40) или ее фармацевтически приемлемой соли; (b) изовалериановой кислоты-DTHFPCI(K(isoGlu-Palm))FEPRSKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:45) или ее фармацевтически приемлемой соли;

(c) изовалериановой кислоты-DTHFPCIKF(K(isoGlu-Palm))PRSKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:46) или ее фармацевтически приемлемой соли; (d) изовалериановой кислоты-DTHFPCIKFEP(K(isoGlu-Palm))SKGCK-NH₂ (SEQ ID NO: 47) или ее фармацевтически приемлемой соли; и (e) изовалериановой кислоты-DTHFPCIKFEP(S(K(isoGlu-Palm)))GCK-NH₂ (SEQ ID NO:48) или ее фармацевтически приемлемой соли, причем, в качестве варианта, аналог гепсидина содержит дисульфидную связь между двумя аминокислотами Cys. В конкретных вариантах осуществления аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе около 10 мг, около 15 мг, около 20 мг, около 25 мг, около 30 мг, около 35 мг, около 40 мг, около 50 мг, около 60 мг, около 70 мг или около 80 мг примерно один раз в неделю в течение периода времени подкожным способом введения. Эффективное количество может варьироваться от одного введения к другому или оставаться неизменным. В некоторых вариантах осуществления дозу титруют в зависимости от уровней гематокрита субъекта в течение определенного периода времени. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя определение гематокрита субъекта после одного или более из многократных введений аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли, и количество дозы, получаемой субъектом во время следующего введения, либо поддерживается, либо корректируется в зависимости от значения гематокрита. Например, следующее вводимое количество может быть увеличено по сравнению с ранее введенным, если установленный

гематокрит субъекта выше допустимого диапазона с учетом пола и состояния беременности субъекта; следующее вводимое количество может быть уменьшено по сравнению с ранее введенным, если установленный гематокрит субъекта ниже допустимого диапазона; или следующее вводимое количество может быть таким же, как и ранее введенное, если установленный гематокрит субъекта находится в пределах допустимого диапазона. В некоторых вариантах осуществления гематокрит субъекта измеряют примерно через трое суток, примерно через четверо суток, примерно через пять суток, примерно через шесть суток или примерно через семь суток после введения аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли. Уровень гематокрита субъекта может быть определен после каждого введения аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли, или может быть определен только после определенных введений аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли, например, один раз в две недели, один раз в месяц, один раз в два месяца, один раз в четыре месяца или один раз в шесть месяцев.

[00232] В различных вариантах осуществления способов и схем лечения, раскрытых в настоящем документе, применение способа приводит к тому, что уровень гематокрита у субъекта составляет $\leq 45\%$. В некоторых вариантах осуществления гематокрит субъекта поддерживают в диапазоне от около 37,5% до около 45% (или в допустимом диапазоне с учетом пола и состояния беременности субъекта) в течение определенного периода времени, например, в течение по меньшей мере одного месяца, по меньшей мере двух месяцев, по меньшей мере шести месяцев или дольше. В конкретных вариантах осуществления способ или схема лечения приводят к снижению гематокрита (Hct%) по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10% и/или к снижению количества кровопусканий по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 40% или по меньшей мере на 50% (например, у пациентов, нуждающихся в кровопусканиях). В контексте настоящего документа снижение гематокрита на 3% означает абсолютное снижение, например, снижение с 46% до 43%.

[00233] В различных вариантах осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, применение способа приводит к повышению уровня ферритина в сыворотке крови субъекта. В конкретных вариантах осуществления уровни сывороточного ферритина увеличиваются по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100% или по меньшей мере на 200% во

время проведения схемы лечения или в течение по меньшей мере одного месяца, по меньшей мере двух месяцев, по меньшей мере шести месяцев или дольше. В конкретных вариантах осуществления уровень сывороточного ферритина субъекта поддерживают в диапазоне от около 25 нг/мл до около 150 нг/мл в течение определенного периода времени, например, в течение по меньшей мере одного месяца, по меньшей мере двух месяцев, по меньшей мере шести месяцев или дольше.

[00234] В различных вариантах осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, применение способа приводит или вызывает снижение уровня насыщения трансферрина (TSAT) субъекта и/или уровня сывороточного железа по меньшей мере на 60% или по меньшей мере на 80%. В некоторых вариантах осуществления уровень TSAT у субъекта снижен до менее чем 40%. В некоторых вариантах осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, применение способа приводит к умеренному увеличению или отсутствию изменения уровней TSAT и/или сывороточного железа, а в некоторых вариантах осуществления уровни TSAT и/или сывороточного железа остаются ниже нормального уровня.

[00235] В различных вариантах осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, применение способа приводит к повышению показателей MCV и/или MCH у субъекта. В конкретных вариантах осуществления показатели MCV и/или MCH увеличиваются по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100% или по меньшей мере на 200% во время проведения схемы лечения или в течение по меньшей мере одного месяца, по меньшей мере двух месяцев, по меньшей мере шести месяцев или дольше.

[00236] В различных вариантах осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, применение способа приводит или вызывает снижение гематокрита и/или количества эритроцитов у субъекта по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60% или по меньшей мере на 80%. В некоторых вариантах осуществления уровень TSAT у субъекта снижен до менее чем 40%. В некоторых вариантах осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, применение способа приводит к умеренному увеличению или отсутствию изменения уровней TSAT и/или сывороточного железа, а в некоторых вариантах осуществления уровни TSAT и/или сывороточного железа остаются ниже нормального уровня.

[00237] В различных вариантах осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, применение способа приводит к тому, что субъект не нуждается или не получает терапевтические кровопускания, например, в течение по меньшей мере 7 недель, по меньшей мере 8 недель, по меньшей мере 9 недель, по меньшей мере 10 недель, по меньшей мере 11 недель или по меньшей мере 12 недель.

[00238] В различных вариантах осуществления, способы, раскрытые в настоящем документе, могут применяться на пациентах с низким или высоким риском PV. В конкретных вариантах осуществления пациент с низким риском PV является пациентом с PV в возрасте до 60 лет. В конкретных вариантах осуществления пациент с высоким риском PV является пациентом с PV, возраст которого старше или равен 60 лет.

[00239] В конкретных вариантах осуществления схема лечения включает в себя два или более, три или более, четыре или более или серийные введения аналога гепсидина в течение определенного периода времени, например, примерно один раз в неделю или примерно один раз в две недели в течение определенного периода времени, в течение по меньшей мере одного месяца, по меньшей мере двух месяцев, по меньшей мере шести месяцев или дольше.

[00240] В различных вариантах осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, применение способа не приводит к существенному изменению количества тромбоцитов у субъекта, например, к увеличению или уменьшению более чем на 50%. В некоторых вариантах осуществления количество тромбоцитов у субъекта не увеличивается или уменьшается более чем на 10%, 20%, 30%, 40% или 50%.

[00241] В различных вариантах осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, применение способа не приводит к существенному изменению количества эритроцитов у субъекта, например, к увеличению или уменьшению более чем на 50%. В некоторых вариантах осуществления количество эритроцитов у субъекта не увеличивается или уменьшается более чем на 10%, 20%, 30%, 40% или 50%.

[00242] В различных вариантах осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, применение способа не приводит к существенному изменению количества лейкоцитов или белых кровяных телец у субъекта, например, к увеличению или уменьшению более чем на 50%. В некоторых вариантах осуществления количество

лейкоцитов или белых кровяных телец у субъекта не увеличивается или уменьшается более чем на 10%, 20%, 30%, 40% или 50%.

[00243] В конкретных вариантах осуществления любого из раскрытых способов, применение способа оказывает на субъекта терапевтический эффект, который может включать в себя ослабление или облегчение одного или более симптомов PV. Эти симптомы включают в себя, помимо прочего, зуд, выпадение волос, усталость, головная боль, нарушения зрения, ночная потливость и тромботические явления.

[00244] В некоторых вариантах осуществления способы настоящего изобретения включают в себя предоставление аналога гепсидина настоящего изобретения (т. е. первого лекарственного средства) нуждающемуся в нем субъекту в комбинации со вторым лекарственным средством. В некоторых вариантах осуществления второе лекарственное средство предоставляется субъекту до и/или одновременно с, и/или после введения субъекту аналога гепсидина. В конкретных вариантах осуществления второе лекарственное средство представляет собой хелатор железа. В некоторых вариантах осуществления второе лекарственное средство выбрано из хелаторов железа Дефероксамина и Деферазирокса (Exjade™). В другом варианте осуществления способ включает в себя введение субъекту третьего лекарственного средства.

[00245] В настоящем изобретении предложены композиции (например, фармацевтические композиции), содержащие один или более аналогов гепсидина настоящего изобретения и фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или разбавитель. Фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель относится к нетоксичному твердому, полутвердому или жидкому наполнителю, разбавителю, инкапсулирующему материалу или вспомогательному составу любого типа.

[00246] Термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает в себя любой из стандартных фармацевтических носителей. Фармацевтически приемлемые носители для терапевтического применения хорошо известны в фармацевтической области и описаны, например, в «Remington's Pharmaceutical Sciences», 17th edition, Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, USA, 1985. Например, можно применять стерильный физиологический раствор и фосфатно-буферный солевой раствор со слабокислым или физиологическим pH. Подходящими буферизирующими

средствами для поддержания pH могут быть, например, фосфат, цитрат, ацетат, трис(гидроксиметил)аминометан (TRIS), N-трис(гидроксиметил)метил-3-аминопропансульфоновая кислота (TAPS), бикарбонат аммония, диэтаноламин, гистидин, аргинин, лизин или ацетат (например, в виде ацетата натрия), или их смеси. Этот термин также охватывает любые средства-носители, перечисленные в Фармакопее США для применения у животных, в том числе у человека.

[00247] В некоторых вариантах осуществления композиции содержат два или более аналогов гепсидина, раскрытых в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления комбинация выбрана из одного из следующих вариантов: (i) любых двух или более пептидных мономеров аналога гепсидина, приведенных в настоящем документе; (ii) любых двух или более пептидных димеров аналога гепсидина, раскрытых в настоящем документе; (iii) любых одного или более пептидных мономеров аналога гепсидина, раскрытых в настоящем документе, и любого одного или более пептидных димеров аналога гепсидина, раскрытых в настоящем документе.

[00248] Следует понимать, что включение аналога гепсидина изобретения (т. е. одного или более пептидных мономеров аналога гепсидина изобретения или одного или более пептидных димеров аналога гепсидина настоящего изобретения) в фармацевтическую композицию также включает в себе включение фармацевтически приемлемой соли или сольвата аналога гепсидина изобретения. В конкретных вариантах осуществления фармацевтические композиции дополнительно содержат один или более фармацевтически приемлемых носителей, наполнителей или плацебо.

[00249] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, для лечения различных состояний, заболеваний или расстройств, как описано в настоящем документе или в других документах (см., например, «Способы лечения» в настоящем документе). В конкретных вариантах осуществления в изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая пептидный мономер аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, для лечения различных состояний, заболеваний или расстройств, как описано в настоящем документе или в других документах (см., например, «Способы лечения» в настоящем документе). В конкретных вариантах осуществления в изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая пептидный димер аналога

гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль или сольват, для лечения различных состояний, заболеваний или расстройств, как описано в настоящем документе.

[00250] Соединения, описанные в настоящем документе, включают в себя изотопно-меченные соединения, которые идентичны указанным в различных формулах и структурах, представленных в настоящем документе, за исключением того, что один или более атомов заменены атомом, имеющим атомную массу или массовое число, отличающееся от атомной массы или массового числа, обычно встречающихся в природе. Примеры изотопов, которые могут быть включены в настоящие соединения, включают в себя изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фтора и хлора, такие как ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl , соответственно. Некоторые изотопно-меченные соединения, описанные в настоящем документе, например, те, в которые включены радиоактивные изотопы, такие как ^3H и ^{14}C , используют для анализов распределения в тканях лекарственного средства и/или субстратов. Кроме того, замена на изотопы, такие как дейтерий, т. е. ^2H , может дать определенные терапевтические преимущества, обусловленные большей метаболической стабильностью, например, увеличить период полувыведения *in vivo* или снизить требования к дозировке.

[00251] Аналоги гепсидина настоящего изобретения могут быть составлены в виде фармацевтических композиций, которые подходят для введения с возможностью хранения или без него, и которые обычно содержат терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного аналога гепсидина изобретения вместе с фармацевтически приемлемым носителем, наполнителем или плацебо.

[00252] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции аналога гепсидина изобретения представлены в стандартной лекарственной форме. В таких формах композиция разделена на стандартные дозы, содержащие соответствующее количество активного компонента или компонентов. Стандартная лекарственная форма может быть представлена в виде упакованного препарата, при этом упаковка содержит дискретное количество препарата, например, упакованные таблетки, капсулы или порошки во флаконах или ампулах. Стандартная лекарственная форма может также представлять собой, например, капсулу, крахмальную капсулу или таблетку как таковую, или это может быть соответствующее количество любой из этих упакованных форм. Стандартная лекарственная форма также может быть представлена в виде

одноразовой инъекционной дозы, например, в виде устройства-ручки, содержащей жидкофазную (обычно водную) композицию. Композиции могут быть составлены для любого подходящего способа и средства введения, например, для любого из способов и средств введения, раскрытых в настоящем документе.

[00253] В конкретных вариантах осуществления аналог гепсидина или фармацевтическая композиция, содержащая аналог гепсидина, суспендирована в матрице с замедленным высвобождением. Матрица с замедленным высвобождением в контексте настоящего документа представляет собой матрицу, изготовленную из материалов, обычно полимеров, которые разлагаются путем ферментативного или кислотно-основного гидролиза или растворения. После введения в организм матрица подвергается воздействию ферментов и жидкостей организма. Матрицу с замедленным высвобождением предпочтительно выбирают из биосовместимых материалов, таких как липосомы, полилактиды (полимолочная кислота), полигликолид (полимер гликолевой кислоты), полилактид-ко-гликолид (сополимеры молочной и гликолевой кислоты), полиангидриды, поли(орто)эфиры, полипептиды, гиалуроновая кислота, коллаген, хондроитинсульфат, карбоновые кислоты, жирные кислоты, фосфолипиды, полисахариды, нуклеиновые кислоты, полиаминокислоты, аминокислоты, такие как фенилаланин, тирозин, изолейцин, полинуклеотиды, поливинилпропилен, поливинилпирролидон и силикон. Один из вариантов осуществления биоразлагаемой матрицы представляет собой матрицу, состоящую из полилактида, полигликолида или полилактид-ко-гликолида (сополимеров молочной и гликолевой кислот).

[00254] В некоторых вариантах осуществления композиции вводят парентерально, подкожно или перорально. В конкретных вариантах осуществления композиции вводят перорально, интрацистернально, интравагинально, интраперитонеально, интаректально, местно (в виде порошков, мазей, капель, суппозиториев или трансдермальных пластырей, в том числе путем интравитреальной, интраназальной доставки и посредством ингаляции) или буккально. Термин «парентеральный» в контексте настоящего документа относится к способам введения, которые включают в себя внутривенную, внутримышечную, интраперитонеальную, интрастернальную, подкожную, внутрикожную и внутрисуставную инъекции и инфузии. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления композиции составлены для доставки любым из этих способов введения.

[00255] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции для парентерального введения содержат фармацевтически приемлемые стерильные водные или неводные растворы, дисперсии, суспензии или эмульсии, или стерильные порошки для разведения в стерильных растворах для инъекций или дисперсиях непосредственно перед применением. Примеры подходящих водных и неводных носителей, разбавителей, растворителей или плацебо включают в себя воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т. п.), карбоксиметилцеллюлозу и их подходящие смеси, бета-циклодекстрин, растительные масла (такие как оливковое масло) и инъекционные органические эфиры, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрывающих материалов, таких как лецитин, путем сохранения требуемого размера частиц в случае дисперсий, а также путем применения поверхностно-активных веществ. Эти композиции могут также содержать адъюванты, такие как консервант, смачивающие агенты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Пролонгированное поглощение инъекционной лекарственной формы может быть обеспечено включением агентов, задерживающих поглощение, таких как моностеарат алюминия и желатин.

[00256] Инъекционные депо-формы включают в себя формы, полученные путем формирования микрокапсульных матриц аналога гепсидина в одном или более биоразлагаемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид, поли(ортоэфиры), поли(ангидриды) и (поли)гликоли, такие как ПЭГ. В зависимости от соотношения пептида и полимера и природы конкретного используемого полимера можно регулировать скорость высвобождения аналога гепсидина. Составы инъекционных депо-форм также получают путем заключения аналога гепсидина в липосомы или микроэмульсии, совместимые с тканями организма.

[00257] Инъекционные составы могут быть стерилизованы, например, путем фильтрации через фильтр, задерживающий бактерии, или путем включения стерилизующих агентов в виде стерильных твердых композиций, которые могут быть растворены или диспергированы в стерильной воде или другой стерильной среде для инъекций непосредственно перед применением.

[00258] Аналоги гепсидина настоящего изобретения можно также вводить в липосомах или других носителях на основе липидов. Как известно в данной области, липосомы

обычно получают из фосфолипидов или других липидных веществ. Липосомы образуют из моно- или мультислойных гидратированных жидких кристаллов, диспергированных в водной среде. Можно применять любой нетоксичный, физиологически приемлемый и метаболизируемый липид, способный образовывать липосомы. Настоящие композиции в виде липосом могут, помимо аналога гепсидина настоящего изобретения, содержать стабилизаторы, консерванты, наполнители и т. п. В некоторых вариантах осуществления липиды включают в себя фосфолипиды, в том числе фосфатидилхолины (лецитины) и серины, как природные, так и синтетические. Способы образования липосом известны в данной области.

[00259] Применяемые в изобретении фармацевтические композиции, пригодные для парентерального введения, могут содержать стерильные водные растворы и/или суспензии пептидных ингибиторов, приведенные в изотоническое состояние по отношению к крови реципиента обычно с помощью хлорида натрия, глицерина, глюкозы, маннита, сорбита и т. п.

[00260] В некоторых аспектах в изобретении предложена фармацевтическая композиция для пероральной доставки. Композиции и аналоги гепсидина настоящего изобретения могут быть приготовлены для перорального введения в соответствии с любым из способов, методов и/или средств доставки, описанных в настоящем документе. Кроме того, специалистам в данной области будет понятно, что аналоги гепсидина настоящего изобретения могут быть модифицированы или интегрированы в систему или средство доставки, которые не раскрыты в настоящем документе, но хорошо известны в данной области и совместимы для применения при пероральной доставке пептидов.

[00261] В некоторых вариантах осуществления составы для перорального введения могут содержать адъюванты (например, резорцинолы и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как олеиловый эфир полиоксиэтилена и н-гексадецилполиэтиленовый эфир) для искусственного повышения проницаемости стенок кишечника и/или ингибиторы ферментов (например, ингибиторы панкреатического трипсина, диизопропилфторфосфат (DFF) или трасилол) для подавления ферментативной деградации. В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина в твердой лекарственной форме для перорального введения может быть смешан по меньшей мере с одной добавкой, такой как сахароза, лактоза, целлюлоза, маннит, трегалоза, раффиноза, мальтит, декстран, крахмал, агар, альгинаты, хитины,

хитозаны, пектины, трагакантовая камедь, гуммиарабик, желатин, коллаген, казеин, альбумин, синтетический или полусинтетический полимер или глицерид. Эти лекарственные формы могут также содержать другой(ие) тип(ы) добавок, например, неактивный разбавитель, лубрикант, такой как стеарат магния, парабен, консервирующий агент, такой как сорбиновая кислота, аскорбиновую кислоту, альфа-токоферол, антиоксиданты, такие как цистеин, разрыхлители, связующие вещества, загустители, буферные агенты, агенты, регулирующие pH, подслащивающие агенты, ароматизаторы или отдушки.

[00262] В конкретных вариантах осуществления пероральные лекарственные формы или стандартные дозы, совместимые для применения с аналогами гепсидина настоящего изобретения, могут включать в себя смесь аналога гепсидина и нелекарственных компонентов или наполнителей, а также другие материалы, не подлежащие повторному использованию, которые могут рассматриваться либо как ингредиент, либо как упаковка. Пероральные композиции могут включать в себя по меньшей мере одну из жидких, твердых и полутвердых лекарственных форм. В некоторых вариантах осуществления предложена пероральная лекарственная форма, содержащая эффективное количество аналога гепсидина, причем лекарственная форма включает в себя по меньшей мере одну из форм, представленных таблеткой, капсулой, гелем, пастой, напитком, сиропом, мазью и суппозиторием. В некоторых случаях предложена пероральная лекарственная форма, которая разработана и выполнена с возможностью достижения отсроченного высвобождения аналога гепсидина в тонкой и/или толстой кишке субъекта.

[00263] В одном варианте осуществления пероральная фармацевтическая композиция, содержащая аналог гепсидина настоящего изобретения, содержит кишечнорастворимую оболочку, предназначенную для задержки высвобождения аналога гепсидина в тонкой кишке. По меньшей мере в некоторых вариантах осуществления предложена фармацевтическая композиция, которая содержит аналог гепсидина настоящего изобретения и ингибитор протеазы, такой как апротинин, в фармацевтическом составе с отсроченным высвобождением. В некоторых случаях фармацевтические композиции настоящего изобретения содержат кишечнорастворимую оболочку, которая растворима в желудочном соке при pH около 5,0 или выше. По меньшей мере в одном варианте осуществления предложена фармацевтическая композиция, содержащая кишечнорастворимую оболочку,

состоящую из полимера с диссоциируемыми карбоксильными группами, такого как производные целлюлозы, в том числе гидроксипропилметилцеллюлозы фталат, ацетат фталат целлюлозы и ацетат-тримеллитат целлюлозы и схожие производные целлюлозы, а также другие углеводные полимеры.

[00264] В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая аналог гепсидина настоящего изобретения, представлена в кишечнорастворимой оболочке, причем кишечнорастворимая оболочка предназначена для защиты и контролируемого высвобождения фармацевтической композиции в нижнем отделе желудочно-кишечного тракта субъекта, а также для предотвращения системных побочных эффектов. Помимо кишечнорастворимых оболочек, аналоги гепсидина настоящего изобретения могут быть инкапсулированы, покрыты оболочкой, заключены или иным образом связаны с любой совместимой системой или компонентом пероральной доставки лекарственного средства. Например, в некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина настоящего изобретения представлен в липидной системе носителя, включающей в себя по меньшей мере один из полимерных гидрогелей, наночастиц, микросфер, мицелл и других липидных систем.

[00265] Для преодоления деградации пептида в тонкой кишке некоторые варианты осуществления настоящего изобретения содержат гидрогелевую полимерную систему носителя, в которой содержится аналог гепсидина настоящего изобретения, при этом гидрогелевый полимер защищает аналог гепсидина от протеолиза в тонкой и/или толстой кишке. Аналоги гепсидина настоящего изобретения могут дополнительно быть составлены для совместимого применения с системой носителя, которая предназначена для повышения кинетики растворения и улучшения кишечной абсорбции пептида. Эти способы включают в себя применение липосом, мицелл и наночастиц для увеличения проницаемости ЖКТ для пептидов.

[00266] Различные биочувствительные системы также могут быть комбинированы с одним или более аналогами гепсидина настоящего изобретения для получения фармацевтического агента для пероральной доставки. В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина настоящего изобретения применяют в комбинации с биочувствительной системой, такой как гидрогели и мукоадгезивные полимеры с группами водородного связывания (например, ПЭГ, поли(метакриловая) кислота [PMAA], целлюлоза, Eudragit®, хитозан и альгинат) для получения лекарственного

средства для перорального введения. Другие варианты осуществления включают в себя способ оптимизации или продления времени удержания лекарственного средства для аналога гепсидина, раскрытого в настоящем документе, причем поверхность аналога гепсидина модифицирована для придания мукоадгезивных свойств посредством водородных связей, полимеров со связанными муцинами или/и гидрофобных взаимодействий. Эти модифицированные пептидные молекулы могут обладать увеличенным временем удержания лекарственного средства в организме субъекта в соответствии с желаемым отличительным признаком изобретения. Более того, нацеленные мукоадгезивные системы могут специфически связываться с рецепторами на поверхности энтероцитов и М-клеток, тем самым дополнительно увеличивая поглощение частиц, содержащих аналог гепсидина.

[00267] Другие варианты осуществления включают в себя способ пероральной доставки аналога гепсидина настоящего изобретения, в котором субъект получает аналог гепсидина в комбинации с усилителями проницаемости, которые способствуют переносу пептидов через слизистую оболочку кишечника путем увеличения парацеллюлярной или трансцеллюлярной проницаемости. Например, в одном варианте осуществления усилитель проницаемости комбинируют с аналогом гепсидина, причем усилитель проницаемости содержит по меньшей мере одно из соединений, представленных длинноцепочечной жирной кислотой, солью желчных кислот, амфифильным поверхностно-активным веществом и хелатирующим агентом. В одном варианте осуществления усилитель проницаемости, содержащий N-[гидроксibenзоил)амино]каприлат натрия, применяют для образования слабой нековалентной ассоциации с аналогом гепсидина настоящего изобретения, причем усилитель проницаемости способствует мембранному переносу и дальнейшей диссоциации после достижения кровотока. В другом варианте осуществления аналог гепсидина настоящего изобретения конъюгирован с олигоаргинином, что увеличивает клеточное проникновение пептида в различные типы клеток. Кроме того, по меньшей мере в одном варианте осуществления имеется нековалентная связь между пептидным ингибитором настоящего изобретения и усилителем проницаемости, выбранным из группы, состоящей из циклодекстрина (CD) и дендримеров, причем усилитель проницаемости уменьшает агрегацию пептида и увеличивает стабильность и растворимость молекулы аналога гепсидина.

[00268] В других вариантах осуществления предложен способ лечения субъекта аналогом гепсидина настоящего изобретения, имеющим увеличенный период полувыведения. В одном аспекте в настоящем изобретении предложен аналог гепсидина, имеющий период полувыведения по меньшей мере от нескольких часов до одних суток *in vitro* или *in vivo* (например, при введении человеку), достаточный для дозирования терапевтически эффективного количества для ежедневного введения (раз/сутки) или введения дважды в сутки (два раза/сутки). В другом варианте осуществления аналог гепсидина имеет период полувыведения трое суток или более, достаточный для еженедельного (раз/неделю) дозирования терапевтически эффективного количества. Кроме того, в другом варианте осуществления аналог гепсидина имеет период полувыведения восемь суток или более, достаточный для дозирования терапевтически эффективного количества для введения один раз в две недели (раз/две недели). В другом варианте осуществления аналог гепсидина дериватизирован или модифицирован таким образом, что имеет более длительный период полувыведения по сравнению с недериватизированным или немодифицированным аналогом гепсидина. В другом варианте осуществления аналог гепсидина содержит одну или более химических модификаций для увеличения периода полужизни в сыворотке крови.

[00269] При применении по меньшей мере в одном из способов лечения или систем доставки, описанных в настоящем документе, аналог гепсидина настоящего изобретения можно использовать в чистом виде или, если такие формы существуют, в виде фармацевтически приемлемой соли.

Дозы

[00270] Общее суточное применение аналогов гепсидина и композиций настоящего изобретения может быть определено лечащим врачом в рамках здравого медицинского суждения. Конкретный уровень терапевтически эффективной дозы для любого конкретного пациента будет зависеть от различных факторов, включающих в себя: а) расстройство, которое лечат, и тяжесть расстройства; b) активность конкретного используемого соединения; c) конкретная используемая композиция, возраст, масса тела, общее состояние здоровья, пол и диета пациента; d) время введения, способ введения и скорость выведения конкретного используемого аналога гепсидина; e) продолжительность лечения; f) препараты, применяемые в комбинации или

одновременно с конкретным используемым аналогом гепсидина; и другие подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

[00271] В конкретных вариантах осуществления общая суточная доза аналогов гепсидина изобретения для введения человеку или другому млекопитающему в разовых или разделенных дозах может составлять, например, от 0,0001 до 300 мг/кг массы тела в сутки или от 1 до 300 мг/кг массы тела в сутки. В некоторых вариантах осуществления доза аналога гепсидина настоящего изобретения находится в диапазоне от около 0,0001 до около 100 мг/кг массы тела в сутки, такого как от около 0,0005 до около 50 мг/кг массы тела в сутки, такого как от около 0,001 до около 10 мг/кг массы тела в сутки, например, от около 0,01 до около 1 мг/кг массы тела в сутки, вводимых в одной или более дозах, например, от одной до трех доз.

[00272] В конкретных вариантах осуществления общая доза составляет от около 10 мг до около 100 мг, или от около 10 мг до около 70 мг, от около 10 мг до около 60 мг, от около 20 мг до около 50 мг, от около 20 мг до около 40 мг, около 30 мг, около 25 мг, около 20 мг, около 15 мг или около 10 мг, например, для пациента-человека. В конкретных вариантах осуществления аналог гепсидина вводят субъекту один раз в неделю. В других конкретных вариантах осуществления аналог гепсидина вводят субъекту два раза в неделю, например, пациенту-человеку.

[00273] В более конкретных вариантах осуществления общая доза составляет около 10 мг, около 15 мг, около 20 мг, около 25 мг, около 30 мг, около 40 мг, около 50 мг, около 60 мг, около 70 мг или около 80 мг один или два раза в неделю пациенту-человеку. В более конкретных вариантах осуществления общая доза составляет около 10 мг, около 15 мг, около 20 мг, около 25 мг, около 30 мг, около 40 мг, около 50 мг, около 60 мг, около 70 мг или около 80 мг примерно один раз в две недели или примерно один раз в месяц пациенту-человеку.

[00274] В различных вариантах осуществления аналог гепсидина изобретения можно вводить непрерывно (например, путем внутривенного введения или другим способом непрерывного введения лекарственного средства), или можно вводить субъекту с интервалами, обычно через регулярные временные интервалы, в зависимости от желаемой дозы и фармацевтической композиции, выбранной квалифицированным специалистом для конкретного субъекта. Регулярные интервалы дозирования включают

в себя, например, один раз в сутки, два раза в сутки, один раз в двое, трое, четверо, пять или шесть суток, один или два раза в неделю, один или два раза в месяц и т. п.

[00275] Такие регулярные режимы введения аналога гепсидина изобретения могут быть при определенных обстоятельствах, таких, например, как при хроническом длительном введении, выгодно прерваны на некоторое время с тем, чтобы субъект, получающий лекарственный препарат, снизил уровень или прекратил прием лекарственного препарата, что часто называют «лекарственными каникулами». Лекарственные каникулы полезны, например, для поддержания или восстановления чувствительности к лекарственному средству, особенно во время длительного хронического лечения, или для уменьшения нежелательных побочных эффектов длительного хронического лечения субъекта лекарственным средством. Выбор времени для лекарственных каникул зависит от графика регулярной схемы применения и цели назначения лекарственных каникул (например, для восстановления чувствительности к лекарственному средству и/или для уменьшения нежелательных побочных эффектов непрерывного длительного введения). В некоторых вариантах осуществления лекарственные каникулы могут представлять собой снижение дозы лекарственного средства (например, до уровня ниже терапевтически эффективного количества в течение определенного интервала времени). В других вариантах осуществления введение лекарственного средства прекращают на определенный интервал времени, после чего возобновляют введение препарата с применением той же или другой схемы применения (например, с более низкой или более высокой дозой и/или частотой введения). Таким образом, лекарственные каникулы для препарата изобретения могут быть выбраны из широкого диапазона временных интервалов и схем применения. Примерный период лекарственных каникул составляет двое или более суток, одну или более недель или один или более месяцев, вплоть до лекарственных каникул сроком около 24 месяцев. Так, например, регулярная ежедневная схема применения пептида, пептидного аналога или димера изобретения можно, например, прерывать лекарственными каникулами на неделю или две недели, или четыре недели, после чего возобновляют прежнюю регулярную схему применения (например, ежедневную или еженедельную схему применения). Предусмотрено множество других схем лекарственных каникул, которые могут быть пригодными для введения аналогов гепсидина изобретения.

[00276] Таким образом, аналоги гепсидина можно доставлять с помощью режима введения, который включает в себя две или более фаз введения, разделенных соответствующими фазами лекарственных каникул.

[00277] В каждую фазу введения аналог гепсидина вводят субъекту-реципиенту в терапевтически эффективном количестве в соответствии с заранее установленной схемой введения. Схема введения может включать в себя непрерывное введение лекарственного средства субъекту-реципиенту на протяжении всей фазы введения. В качестве варианта, схема введения может включать в себя введение множества доз аналога гепсидина субъекту-реципиенту, причем указанные дозы разделены интервалами дозирования.

[00278] Схема дозирования может включать в себя по меньшей мере две дозы в фазу введения, по меньшей мере пять доз в фазу введения, по меньшей мере 10 доз в фазу введения, по меньшей мере 20 доз в фазу введения, по меньшей мере 30 доз в фазу введения или более.

[00279] Указанные интервалы дозирования могут быть регулярными интервалами дозирования, которые могут быть такими, как указано выше, включая в себя один раз в сутки, два раза в сутки, один раз в двое, трое, четверо, пять или шесть суток, один или два раза в неделю, один или два раза в месяц, или регулярными и даже менее частыми интервалами дозирования в зависимости от конкретной лекарственной формы, биодоступности и фармакокинетического профиля аналога гепсидина настоящего изобретения.

[00280] Фаза введения может иметь продолжительность по меньшей мере двое суток, по меньшей мере неделю, по меньшей мере 2 недели, по меньшей мере 4 недели, по меньшей мере один месяц, по меньшей мере 2 месяца, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 6 месяцев или более.

[00281] Если схема введения включает в себя множество доз, то продолжительность следующей фазы лекарственных каникул больше, чем интервал дозирования, применяемый в данной схеме введения. Если интервал дозирования нерегулярный, то продолжительность фазы лекарственных каникул может быть больше, чем средний интервал между дозами в течение фазы введения. В качестве варианта,

продолжительность лекарственных каникул может быть больше, чем самый длинный интервал между последовательными дозами во время фазы введения.

[00282] Продолжительность фазы лекарственных каникул может быть по меньшей мере в два раза больше соответствующего интервала дозирования (или его среднего значения), по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз или по меньшей мере в 20 раз больше соответствующего интервала дозирования или его среднего значения.

[00283] В рамках этих ограничений фаза лекарственных каникул может иметь продолжительность по меньшей мере двое суток, по меньшей мере неделю, по меньшей мере 2 недели, по меньшей мере 4 недели, по меньшей мере один месяц, по меньшей мере 2 месяца, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 6 месяцев или более в зависимости от схемы введения во время предыдущей фазы введения.

[00284] Режим введения включает в себя по меньшей мере 2 фазы введения. Последовательные фазы введения разделены соответствующими фазами лекарственных каникул. Таким образом, режим введения может включать в себя по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25 или по меньшей мере 30 фаз введения или более, каждая из которых разделена соответствующими фазами лекарственных каникул.

[00285] В последовательных фазах введения можно применять одну и ту же схему введения, хотя это не всегда желательно или необходимо. Однако если другие лекарственные средства или активные агенты вводят в комбинации с аналогом гепсидина изобретения, то обычно в последовательных фазах введения приводят одну и ту же комбинацию лекарственных средств или активных агентов. В некоторых вариантах осуществления субъект-реципиент является человеком.

[00286] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены композиции и лекарственные препараты, содержащие по меньшей мере один аналог гепсидина, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ производства лекарственных препаратов, содержащих по меньшей мере один аналог гепсидина, как описано в настоящем документе, для лечения заболеваний метаболизма железа, таких как заболевания, связанные с перегрузкой железом. В некоторых вариантах осуществления в настоящем

изобретении предложен способ производства лекарственных препаратов, содержащих по меньшей мере один аналог гепсидина, как описано в настоящем документе, для лечения диабета (типа I или типа II), инсулиновой резистентности или нарушения толерантности к глюкозе. Также предложены способы лечения заболевания метаболизма железа у субъекта, такого как субъект-млекопитающее, и предпочтительно субъекта-человека, включающие в себя введение субъекту по меньшей мере одного аналога гепсидина или композиции, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина или композицию вводят в терапевтически эффективном количестве. Также предложены способы лечения диабета (типа I или типа II), инсулиновой резистентности или нарушения толерантности к глюкозе у субъекта, такого как субъект-млекопитающее, и предпочтительно субъекта-человека, включающие в себя введение субъекту по меньшей мере одного аналога гепсидина или композиции, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина или композицию вводят в терапевтически эффективном количестве.

[00287] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложена технология производства аналога гепсидина или композиции аналога гепсидина (например, фармацевтической композиции), как описано в настоящем документе.

[00288] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложено устройство, содержащее по меньшей мере один аналог гепсидина настоящего изобретения или его фармацевтически приемлемую соль или сольват для доставки аналога гепсидина субъекту.

[00289] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены способы связывания ферропортина или индуцирования интернализации и деградации ферропортина, которые включают в себя контактирование ферропортина по меньшей мере с одним аналогом гепсидина или композицией аналога гепсидина, как описано в настоящем документе.

[00290] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены наборы, содержащие по меньшей мере один аналог гепсидина или композицию аналога гепсидина (например, фармацевтическую композицию), как описано в настоящем

документе, упакованную вместе с реагентом, устройством, инструктивным материалом или их комбинацией.

[00291] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ введения аналога гепсидина или композиции аналога гепсидина (например, фармацевтической композиции) настоящего изобретения субъекту *посредством* имплантата или осмотического насоса, с помощью картриджа или микронасоса, или другими способами, понятными квалифицированному специалисту как широко известные в данной области.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены комплексы, которые содержат по меньшей мере один аналог гепсидина, как описано в настоящем документе, связанный с ферропортином, предпочтительно человеческим ферропортином, или антителом, таким как антитело, специфически связывающееся с аналогом гепсидина, как описано в настоящем документе, Her25, или их комбинацией.

[00292] В некоторых вариантах осуществления размер аналога гепсидина настоящего изобретения (например, EC50) составляет менее 500 нмоль при анализе интернализации Frp. Как будет понятно специалисту, функция аналога гепсидина зависит от третичной структуры аналога гепсидина и представленной поверхности связывания. Поэтому можно внести незначительные изменения в последовательность, кодирующую аналог гепсидина, которые не влияют на сворачивание или не находятся на поверхности связывания, и сохранить функцию. В других вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен аналог гепсидина, имеющий 85% или более (например, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5%) идентичность или гомологию с аминокислотной последовательностью любого аналога гепсидина, описанного в настоящем документе, который проявляет активность (например, гепсидиновую активность) или уменьшает симптом заболевания или признак, в развитии которых участвует гепсидин.

[00293] В других вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен аналог гепсидина, имеющий 85% или более (например, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,5%) идентичность или гомологию с аминокислотной последовательностью любого аналога гепсидина, представленного в настоящем

документе, или пептида согласно любой из формул, или аналогов гепсидина, описанных в настоящем документе.

[00294] В некоторых вариантах осуществления аналог гепсидина настоящего изобретения может содержать функциональные фрагменты или их варианты, имеющие не более 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотных замен по сравнению с одной или более конкретными последовательностями пептидных аналогов, указанных в настоящем документе.

[00295] В дополнение к способам, описанным в примерах в настоящем документе, аналоги гепсидина настоящего изобретения могут быть получены с помощью способов, известных в данной области, в том числе химического синтеза, биосинтеза или синтеза *in vitro* с применением технологий рекомбинантных ДНК и твердофазного синтеза. См., например, Kelly & Winkler (1990) *Genetic Engineering Principles and Methods*, vol. 12, J. K. Setlow ed., Plenum Press, NY, pp. 1-19; Merrifield (1964) *J Amer Chem Soc* 85:2149; Houghten (1985) *PNAS USA* 82:5131-5135; и Stewart & Young (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ed. Pierce, Rockford, IL, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Аналоги гепсидина настоящего изобретения могут быть очищены с помощью известных в данной области методов очистки белков, таких как обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), ионообменная или иммуноаффинная хроматография, фильтрация или разделение по размеру, или электрофорез. См. Olsnes, S. and A. Pihl (1973) *Biochem.* 12(16):3121-3126; и Scopes (1982) *Protein Purification*, Springer-Verlag, NY, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. В качестве варианта, аналоги гепсидина настоящего изобретения могут быть получены с помощью технологий рекомбинантных ДНК, известных в данной области. Таким образом, в настоящем документе рассматриваются полинуклеотиды, кодирующие полипептиды настоящего изобретения. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления выделяют полинуклеотиды. В контексте настоящего документа «выделенный полинуклеотид» относится к полинуклеотидам, которые находятся в среде, отличной от той, в которой полинуклеотид встречается в природе.

ПРИМЕРЫ

[00296]В следующих примерах продемонстрированы некоторые конкретные варианты осуществления настоящего изобретения. Следующие примеры были выполнены с применением стандартных методик, хорошо известных и обычных для специалистов в данной области, за исключением случаев, когда подробно описано иное. Следует понимать, что эти примеры приведены исключительно в иллюстративных целях и не претендуют на то, чтобы быть полностью определенными в отношении условий или объема изобретения. Следовательно их не следует толковать как ограничивающие объем настоящего изобретения.

СОКРАЩЕНИЯ:

DCM: дихлорметан

DMF: N,N-диметилформамид

NMP: N-метилпирролидон

HBTU: O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуронийгексафторфосфат

HATU: 2-(7-аза-1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуронийгексафторфосфат

DCC: дициклогексилкарбодиимид

NHS: N-гидроксисукцинимид

DIPEA: диизопропилэтиламин

EtOH: этанол

Et₂O: диэтиловый эфир

H₂: водород

TFA: трифторуксусная кислота

TIS: триизопропилсилан

ACN: ацетонитрил

ВЭЖХ: высокоэффективная жидкостная хроматография

ESI-MS: масс-спектрометрия с электрораспылительной ионизацией

ФСБ: фосфатно-солевой буфер

Вос: трет-бутоксикарбонил

Fmoc: фторенилметилоксикарбонил

Асм: ацетамидометил

IVA: изовалериановая кислота (или изовалерил)

[00297] K(): В представленных в настоящем документе пептидных последовательностях, в которых соединение или химическая группа представлены в скобках непосредственно после остатка лизина, следует понимать, что соединение или химическая группа в скобках представляет собой боковую цепь, конъюгированную с остатком лизина. Так, например, но без каких-либо ограничений, K-[(PEG8)]- указывает на то, что фрагмент PEG8 конъюгирован с боковой цепью данного лизина.

[00298] Palm: Указывает на конъюгацию пальмитиновой кислоты (пальмитоил).

[00299] В контексте настоящего документа «C()» относится к остатку цистеина, участвующему в конкретном дисульфидном мостике. Например, в гепсидине имеется четыре дисульфидных мостика: первый между двумя остатками C(1), второй между двумя остатками C(2), третий между двумя остатками C(3) и четвертый между двумя остатками C(4). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления последовательность для гепсидина записана следующим образом:

Hy-DTHFPIC(1)IFC(2)C(3)GC(2)C(4)HRSKC(3)GMC(4)C(1)KT-OH; и
последовательность для других пептидов может быть также, в качестве варианта, записана таким же образом.

ПРИМЕР 1.

СИНТЕЗ ПЕПТИДНЫХ АНАЛОГОВ

[00300] Если не указано иное, реагенты и растворители, использованные в дальнейшем, были доступны на рынке в виде стандартных лабораторных реагентов или реагентов для аналитических целей и применялись без дополнительной очистки.

Процедура твердофазного синтеза пептидов

[00301] Пептидные аналоги изобретения были химически синтезированы с помощью оптимизированных протоколов твердофазного пептидного синтеза на основе 9-фторенилметоксикарбонила (Fmoc). Для получения С-концевых амидов применяли амидную смолу Ринка, хотя для получения С-концевых кислот также применялись смола Ванга и тритильная смола. Защитные группы боковых цепей были следующими: Glu, Thr и Tyr: О-бутил; Trp и Lys: t-Вос (трет-бутилоксикарбонил); Arg: N-гамма-2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил; His, Gln, Asn, Cys: тритил. Для селективного образования дисульфидных мостиков в качестве защитной группы Cys также применяли Асм (ацетамидометил). Для образования соединения от четырех- до десятикратного избытка раствора, содержащего аминокислоту Fmoc, HBTU и DIPEA (1:1:1,1) в DMF добавляли к набухшей смоле [HBTU: О-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуронийгексафторфосфат; DIPEA: диизопропилэтиламин; DMF: диметилформамид]. В сложных участках для повышения эффективности образования соединения применяли НАТУ (О-(7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3,-тетраметилуронийгексафторфосфат) вместо HBTU. Удаление защитной группы Fmoc выполняли обработкой раствором DMF с пиперидином (2:1).

Процедура отщепления пептидов от смолы

[00302] Снятие защиты боковых цепей и отщепление пептидных аналогов изобретения (например, соединения № 2) выполняли путем перемешивания сухой смолы в растворе, содержащем трифторуксусную кислоту, воду, этандитиол и триизопропилсилан (90:5:2,5:2,5) в течение от 2 до 4 часов. После удаления TFA пептид осаждали с помощью ледяного диэтилового эфира. Раствор центрифугировали, эфир декантировали, после чего проводили вторую промывку диэтиловым эфиром. Пептид растворяли в растворе ацетонитрила и воды (1:1), содержащем 0,1% TFA (трифторуксусной кислоты), и полученный раствор фильтровали. Качество линейного пептида оценивали с помощью масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией (ESI-MS).

Процедура очистки пептидов

[00303] Очистку пептидов изобретения (например, соединения № 2) проводили с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-

ВЭЖХ). Анализ проводили с помощью колонки C18 (3 мкм, 50 x 2 мм) со скоростью потока 1 мл/мин. Очистку линейных пептидов проводили с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ на колонке C18 (5 мкм, 250 x 21,2 мм) со скоростью потока 20 мл/мин. Разделение выполняли с помощью линейных градиентов буфера В в А (буфер А: водный 0,05% TFA; буфер В: 0,043% TFA, 90% ацетонитрила в воде).

Процедура окисления пептидов

[00304] Способ А (окисление одного дисульфида). Окисление незащищенных пептидов изобретения проводили путем добавления по каплям йода в MeOH (1 мг на 1 мл) к пептиду в растворе (ACN:H₂O, 7: 3, 0,5% TFA). После перемешивания в течение 2 минут порционно добавляли аскорбиновую кислоту, пока раствор не становился прозрачным, и образец немедленно загружали в ВЭЖХ для очистки.

[00305] Способ В (селективное окисление двух дисульфидов). При наличии более одного дисульфида часто проводили селективное окисление. Окисление свободных цистеинов проводили при pH 7,6 раствором NH₄CO₃ при концентрации 1 мг/10 мл пептида. После перемешивания в течение 24 ч и перед очисткой раствор подкисляли до pH 3 с помощью TFA с последующей лиофилизацией. Полученные однократно окисленные пептиды (с цистеинами, защищенными ACM) затем окисляли / подвергали селективному снятию защиты с помощью раствора йода. Пептид (1 мг на 2 мл) растворяли в MeOH/H₂O, добавляли йод, растворенный в реакционном растворителе 80:20 (конечная концентрация: 5 мг/мл) при комнатной температуре. Раствор перемешивали в течение 7 минут, затем порционно добавляли аскорбиновую кислоту до получения прозрачного раствора. Затем раствор загружали непосредственно в ВЭЖХ.

[00306] Способ С (нативное окисление). При наличии более одного дисульфида и если не выполняли селективное окисление, то проводили нативное окисление. Нативное окисление выполняли 100 ммоль раствором NH₄CO₃ (pH 7,4) в присутствии окисленного и восстановленного глутатиона (пептид/GSH/GSSG, молярное соотношение 1:100:10) из (пептид: GSSG: GSH, 1:10, 100). После перемешивания в течение 24 ч и перед очисткой ОФ-ВЭЖХ раствор подкисляли до pH 3 с помощью TFA с последующей лиофилизацией.

[00307] Процедура окисления цистеина для получения димеров. Окисление незащищенных пептидов изобретения проводили путем добавления по каплям йода в MeOH (1 мг на 1 мл) к пептиду в растворе (ACN: H₂O, 7: 3, 0,5% TFA). После перемешивания в течение 2 минут порционно добавляли аскорбиновую кислоту, пока раствор не становился прозрачным, и образец немедленно загружали в ВЭЖХ для очистки.

Процедура димеризации.

[00308] Глиоксиловая кислота (DIG), IDA или Fmoc-β-Ala-IDA были предварительно активированы в виде N-гидроксисукцинимидного эфира путем обработки 1 эквивалента (сокращенно «экв.») кислоты 2,2 экв. N-гидроксисукцинимидом (NHS) и дициклогексилкарбодиимида (DCC) в NMP (N-метилпирролидон) при конечной концентрации 0,1 М. Что касается линкеров ПЭГ13 и ПЭГ25, то эти химические соединения были приобретены в готовом состоянии в виде активированного сложного сукцинимидного эфира. Активированный эфир ~0,4 экв. медленно порционно добавляли к пептиду в NMP (1 мг/мл). Раствор перемешивали в течение 10 минут, после чего медленно добавляли еще 2–3 аликвоты линкера ~0,05 экв. Раствор перемешивали еще в течение 3 ч, затем удаляли растворитель под *вакуумом*, а остаток очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Был проведен дополнительный этап перемешивания пептида в 20% пиперидине в DMF (2 x 10 мин) перед дополнительной очисткой с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ.

[00309] Специалистам в данной области будет понятно, что для получения соединений изобретения могут быть применены стандартные способы синтеза пептидов.

Активация и димеризация линкеров

[00310] Пептидные мономерные субъединицы соединяли для образования пептидных димеров аналога гепсидина, как описано ниже.

[00311] Процедура активации линкера DIG в небольших объемах: 5 мл NMP добавляли в стеклянный флакон, содержащий дикарбоновую кислоту IDA (304,2 мг, 1 ммоль), N-гидроксисукцинимид (NHS, 253,2 мг, 2,2 экв. 2,2 ммоль) и мешалку. Смесь перемешивали при комнатной температуре до полного растворения твердого сырья.

Затем к смеси добавили N, N'-дициклогексилкарбодиимид (DCC, 453,9 мг, 2,2 экв., 2,2 ммоль). Осадок выпал в течение 10 минут, и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Затем реакционную смесь фильтровали для удаления осажденной дициклогексилмочевины (DCU). Активированный линкер хранился в закрытом флаконе до его применения для димеризации. Номинальная концентрация активированного линкера составляла приблизительно 0,20 М.

[00312] При димеризации с применением ПЭГ-линкеров этап предварительной активации не проводился. Применялись доступные на рынке предварительно активированные бифункциональные ПЭГ-линкеры.

[00313] Процедура димеризации: 2 мл безводного DMF добавляли во флакон, содержащий пептидный мономер (0,1 ммоль). pH пептида доводили до 8~9 с помощью DIEA. Активированный линкер (IDA или ПЭГ13, ПЭГ25) (0,48 экв. относительно мономера, 0,048 ммоль) затем добавляли к раствору мономера. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение одного часа. Завершение реакции димеризации контролировали с помощью аналитической ВЭЖХ. Время завершения реакции димеризации варьировалось в зависимости от линкера. После завершения реакции пептид осаждали в холодном эфире и центрифугировали. С надосадочной жидкости удаляли слой эфира. Этап осаждения повторяли дважды. Затем необработанный димер очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ (система Luna C18, 10 мкм, 100 Å, подвижная фаза А: вода, содержащая 0,1% TFA, подвижная фаза В: ацетонитрил (ACN), содержащий 0,1% TFA, градиент 15%В и изменение до 45%В в течение 60 минут, скорость потока 15 мл/мин). Фракции, содержащие чистый продукт, затем подвергали сублимационной сушке на лиофилизаторе.

[00314] Конъюгация фрагментов, увеличивающих период полувыведения

[00315] Конъюгацию пептидов проводили на смоле. В качестве ключевой аминокислоты применяли Lys(ivDde). После сборки пептида на смоле проводили селективное снятие защиты группы ivDde с помощью 3 x 5 мин 2% гидразина в DMF в течение 5 мин. В результате активации и ацилирования линкера с помощью HBTU, DIEA 1-2 эквивалента в течение 3 ч, удаления Fmoc с последующим повторным ацилированием липидной кислотой получали конъюгированный пептид.

ПРИМЕР 2

АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДНЫХ АНАЛОГОВ

[00316] Пептидные аналоги испытывали *in vitro* на индукцию интернализации человеческого белка ферропортина. После интернализации пептиды разрушаются. В ходе анализа измеряют снижение флуоресценции рецептора.

[00317] кДНК, кодирующую ферропортин человека (SLC40A1), клонировали из клона кДНК от Origene (NM_014585). ДНК, кодирующая ферропортин, была амплифицирована методом ПЦР с применением праймеров, также кодирующих терминальные сайты рестрикции для субклонирования, но без терминирующего кодона. Рецептор ферропортина субклонировали в вектор экспрессии GFP млекопитающих, содержащий маркер устойчивости к неомицину (G418), таким образом, что рамка считывания ферропортина была слита в рамке с белком GFP. Правильность ДНК, кодирующей белок, была подтверждена секвенированием ДНК. Клетки НЕК293 применяли для трансфекции экспрессионной плазмиды для экспрессии рецептора ферропортина-GFP. Клетки выращивали согласно стандартному протоколу в ростовой среде и трансфицировали плазмидами с помощью Липофектамина (протокол производителя, Invitrogen). Клетки, стабильно экспрессирующие ферропортин-GFP, отбирали с помощью G418 в ростовой среде (при этом выживают только те клетки, которые захватили и включили экспрессионную плазмиду с кДНК) и сортировали несколько раз на клеточном сортере Cytomation MoFlo™ для получения GFP-положительных клеток (488 нм / 530 нм). Клетки были размножены и заморожены в аликвотах.

[00318] Для определения активности аналогов гепсидина (соединений) в отношении человеческого ферропортина клетки инкубировали в 96-луночных планшетах в стандартной среде, без фенолового красного. Соединение добавляли до желаемой конечной концентрации в течение по меньшей мере 18 часов в инкубаторе. После инкубации оставшуюся GFP-флуоресценцию определяли либо по цельноклеточной GFP-флуоресценции (планшетный анализатор Envision, пара фильтров 485 / 535), либо на проточном цитометре Beckman Coulter Quanta™ (выражают как среднее геометрическое значение интенсивности флуоресценции при 485 нм / 525 нм). Соединение добавляли до желаемой конечной концентрации в течение по меньшей мере 18 часов, но не более 24 часов в инкубаторе.

[00319] В некоторых экспериментах эталонные соединения включали в себя нативный гепсидин, минигепсидин и R1-минигепсидин, который является аналогом минигепсидина. «RI» в RI-минигепсидине означает ретро-инвертированный. Ретро-инвертированный пептид представляет собой пептид с обратной последовательностью всех D аминокислот. Например, Hy-Glu-Thr-His-NH₂ превращается в Hy-DHis-DThr-DGlu-NH₂. EC₅₀ этих эталонных соединений для деградации ферропортина определяли в соответствии с описанным выше анализом активности. Эти пептиды служили в качестве контрольных стандартов.

Таблица 6. Эталонные соединения

Название	Последовательность	Активность EC ₅₀ (нмоль)
Гепсидин	Hy-DTHFPIC(1)IFC(2)C(3)GC(2)C(4)HRSKC(3)GM C(4)C(1)KT-OH (SEQ ID NO: 56)	34
Минигепсидин	Hy-DTHFPICIF-NH ₂ (SEQ ID NO: 57)	712
RI- минигепсидин	Hy-DPhe-DIle-DCys-DIle-DPro-DPhe-DHis- DThr-DAsp-NH ₂ (SEQ ID NO: 58)	> 10 мкмоль

[00320] Значения активности EC₅₀ (нмоль), определенные для различных пептидных аналогов настоящего изобретения, и другие данные об активности представлены в выданных патентах US 9,822,157 и US 10,030,061. Эти патенты включены в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

ПРИМЕР 3

ИНГИБИРОВАНИЕ ГЕПСИДИНА ПРИ ИСТИННОЙ ПОЛИЦИТЕМИИ

[00321] Аналоги гепсидина настоящего изобретения испытаны в отношении своей активности при истинной полицитемии, как описано Casu et al., Blood. 2016; 128(2):265-276.

[00322] Гепсидин, 25-аминокислотный пептид, регулирует системный гомеостаз железа и вырабатывается печенью в ответ на концентрацию железа в плазме и запасы железа. Гепсидин ингибирует клеточный экспортер железа ферропортин (FPN-1), который экспрессируется на поверхности клеток, участвующих в поглощении, переработке и хранении железа. Гепсидин модулирует системное ограничение железа, а экзогенное введение экзогенного миметика гепсидина снижало концентрации Hgb и уменьшало спленомегалию в мышинной модели истинной полицитемии (Casu et al, Blood. 2016;128(2):265-276).

[00323] При конститутивной активации JAK2 запускается эритропоэтиннезависимое образование эритроцитов, что приводит к полицитемии. Стратегия по предотвращению эффекта мутировавшего Jak2 заключается в том, чтобы вызвать ограничение железа с помощью гепсидина или пептидов гепсидиновых миметиков. Низкий уровень железа ингибирует сигнализацию эритропоэтина в точке по ходу транскрипции Jak2, тем самым обеспечивая блокирующий сигнал. При введении пептидов гепсидиновых миметиков трансгенным мышам, которые экспрессируют человеческий ген Jak2, несущий мутацию, вызывающую полицитемию, увеличенное образование эритроцитов и высокий гематокрит, характерные для истинной полицитемии, возвращаются к норме. (Casu et al, Blood. 2016;128(2):265-276).

ПРИМЕР 4

ВАЛИДАЦИЯ ПЕПТИДНЫХ АНАЛОГОВ ГЕПСИДИНА *IN VIVO*

[00324] Аналоги гепсидина настоящего изобретения были протестированы на активность *in vivo* для определения их способности снижать содержание свободного Fe²⁺ в сыворотке крови.

[00325] В эксперименте PK-PD аналоги гепсидина (соединение А (SEQ ID NO:45) или соединение В (SEQ ID NO:55)) или контрольное плацебо вводили обезьянам *Cynomolgus* (n=3/группа) в дозе 2,44 мг/кг соединения А или 2,93 мг/кг соединения В подкожно. Образцы сыворотки были взяты у групп обезьян, которым вводили аналоги гепсидина, через 0,5 ч, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 8 ч, 12 ч, 24 ч, 30 ч, 36 ч, 48 ч, 60 ч, 72 ч и 144 ч после введения дозы. Содержание железа в плазме/сыворотке крови измеряли с помощью колориметрического анализа на приборе Cobas c111 в соответствии с инструкциями производителя анализа (анализ: IRON2: ACN 661). Данные, полученные

в результате анализа Cobas Iron2, представлены на фигуре 1А для соединения А и фигуре 1В для соединения В (в виде средних значений с СО). Соединение А приводило примерно к 5-кратному снижению уровня железа в сыворотке крови через 8 часов после введения соединения. Снижение уровня сывороточного железа для соединения В было максимальным примерно через 12 часов после введения соединения, и он оказался в 12 раз ниже уровней до введения дозы.

[00326] Эти исследования показывают, что аналоги гепсидина настоящего изобретения снижают уровень сывороточного железа в течение по меньшей мере 60 часов при введении дозы обезьянам *Cynomolgus*. Как для соединения А, так и для соединения В наблюдается эффект снижения сывороточного железа в зависимости от концентрации. Также наблюдается задержка между сывороточной концентрацией аналога гепсидина и соответствующим эффектом, т. е. надир эффекта наступал с задержкой от пиковой сывороточной концентрации соединения. Для соединения А эффективными были сывороточные концентрации в диапазоне от 200 до 3200 нг/мл, при этом максимальный эффект наблюдался при 1000–3200 нг/мл. Для соединения В эффект наблюдался при сывороточных концентрациях 25–125 нг/мл, при этом максимальный эффект наблюдался при 50–125 нг/мл.

ПРИМЕР 5

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПЕПТИДОВ В ОГРАНИЧЕНИИ ЭРИТРОПОЭЗА

[00327] Аналоги гепсидина настоящего изобретения были протестированы на эффективность в ограничении эритропоэтической активности при введении их здоровым обезьянам *Cynomolgus*. В исследовании с многократным введением препарата 4 еженедельные дозы соединения А или контрольного плацебо вводили подкожно (SC) обезьянам *Cynomolgus* в трех различных дозах 0,6 мг/кг/доза, 2 мг/кг/доза или 6 мг/кг/доза ($n = 6$ / пол/ группы с высокой дозой или контролем и $n = 3$ / пол / группы с низкой или средней дозой).

[00328] Соединение А в дозе ≥ 3 мг/кг/доза вызывало фармакологически опосредованную анемию, а именно дозо- и времязависимое снижение гематокрита (Hct) и гемоглобина (Hgb) (таблица 7 и фигура 2). На 29-й день уровни Hgb у мужчин, получавших 1, 3 и 10 мг/кг соединения А, снизились на 0,1, 2,7 и 7,2 г/дл по сравнению с параллельным контролем, соответственно. Уровни Hct в абсолютном выражении

снизились на 6% и 22% в группах самцов, получавших 3 и 10 мг/кг/доза, соответственно. У самцов фармакологические реакции были схожи с таковыми у самок. Ретикулоцитоз возник после длительного снижения количества эритроцитов (RBC), причем статистически значимое увеличение наблюдалось на 29-й день. После прекращения введения препарата параметры RBC вернулись к параллельным контрольным значениям.

Таблица 7. Изменения гематокрита и гемоглобина по сравнению с параллельным контролем у NHP, которым вводили соединение А подкожно один раз в неделю в количестве 4 доз, после чего следовал 28-дневный период восстановления.

Доза (мг/кг/доза)	День 7 ¹		День 29 ¹		День 56(восстановление) ¹	
	M	F	M	F	M	F
% Hct						
0	36	35	40	37	41	38
1 ²	+2	0	0	0	—	—
3	-1	-2	-6	-5	—	—
10	-1	-2	-22***	-17***	+4	0
Hgb (г/дл)						
0	11,1	11,4	12,2	11,8	13,1	12,5
1	+0,9	-0,5	-0,1	-0,8	—	—
3	-0,1	-0,9	-2,7**	-2,7**	—	—
10	-0,2	-1,4**	-7,2***	-6,5***	+1,2	-0,4

¹Образцы отбирали через 6 дней после введения 1^{-й} дозы, 7 дней после введения 4-й дозы и на 56-й день у восстанавливающихся животных (34 день после введения 4^{-й} дозы).

²Изменения представляют собой значения по сравнению с параллельными контролями, при этом данные, вероятно, могут быть более точными и иметь большую статистическую значимость (меньшая группа), если выразить их как изменения для отдельных животных, т. е. изменения по сравнению с уровнями до введения дозы.

** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ по сравнению с параллельным контролем.

[00329] Уровни гематокрита и вторичные гематологические показатели, включающие в себя средний объем эритроцита (MCV), среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (MCHC) и среднее содержание Hgb в эритроците (MCH), отражающие объем и содержание Hgb в эритроцитах, показаны на фигуре 2. Эритроциты, образовавшиеся в результате эритропоэза, ограниченного железом, вызванного соединением А, по размеру (MCV) сходны с контрольными, но в них наблюдается дозозависимое снижение концентрации Hgb на клетку (MCHC и MCH) по сравнению с контрольными. После выздоровления контрольная группа с плацебо и группа с дозировкой соединения А 10 мг/кг показали сходную обратимость гематологических изменений. Обнаруженные гематологические показатели можно было бы ожидать после выраженной и продолжительной анемии с ограничением железа у животных, изначально получавших железо в достаточном количестве.

ПРИМЕР 6

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПЕПТИДОВ В ОГРАНИЧЕНИИ ЭРИТРОПОЭЗА

[00330] В другом исследовании с многократным введением препарата, обезьянам *Cynomolgus* подкожно вводили 13 еженедельных доз соединения А или контрольного плацебо в трех различных дозах, после чего следовал 5-недельный период восстановления.

[00331] Обезьянам *Cynomolgus* (6/пол/группа) подкожно вводили дозы 0 (0,9% физраствор), 0,6, 2 или 6 мг/кг/доза соединения А, QW в течение 3 месяцев, в общей сложности 13 доз (дни 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 и 85). Когорта животных (4/пол/группа) была умерщвлена на 92-й день (основная), а остальные животные (2/пол/группа) были умерщвлены на 120-й день после 35-дневного периода восстановления (восстановление). Образцы для исследования крови были получены дважды до начала лечения (дни -7 и -3), а также на 27, 55 и 90 дни для животных

основной когорты и восстанавливающихся животных, что соответствует 5 дням после введения 4-й, 8-й и 13-й доз, и на 119-й день для восстанавливающихся животных.

[00332] Гематологические изменения соответствовали ожидаемой фармакологической эффективности миметика гепсидина, вводимого NHP с повышенным содержанием железа, и включали в себя дозозависимое снижение параметров эритроцитов (количество эритроцитов, Hgb и Hct) и увеличение ретикулоцитов, а также изменение показателей эритроцитов (снижение MCHC и MCH) и морфологии эритроцитов (например, микроцитоз и гипохромия) (данные не приведены). Вследствие анемии, вызванной соединением A, в костном мозге (бедренная кость, грудина) и экстрамедуллярном кроветворении наблюдалась гиперклеточность гемопоэтических клеток и отложение гемосидерина в печени и селезенке (коррелировало с увеличением веса органа при дозе 6 мг/кг/доза) при дозе ≥ 2 мг/кг/доза (данные не показаны).

[00333] Наблюдались гематологические изменения, соответствующие известному фармакологическому действию миметика гепсидина на эритропоэз, вызывающего железодефицитную анемию (таблица 8). На 90-й день уровень Hgb у самок, получавших 0,6, 2 и 6 мг/кг соединения A, снизился на 1,3, 3,0 и 5,6 г/дл по сравнению с параллельным контролем, соответственно. У самцов фармакологические реакции были схожи с таковыми у самок. Ретикулоциты были повышены во всех временных точках фазы введения доз дозозависимым образом в качестве реакции на анемию. После прекращения введения препарата параметры RBC вернулись к параллельным контрольным значениям.

Таблица 8. Изменения гематокрита и гемоглобина по сравнению с параллельным контролем у NHP, которым вводили соединение A подкожно один раз в неделю в течение 13 недель, после чего следовал 35-дневный период восстановления.

Доза (мг/кг/доза)	День 27 ¹		День 55 ¹		День 90 ¹		День 119 ¹ (восстановление)	
	M	F	M	F	M	F	M	F
% Hct								
0	44	43	45	44	40	40	42	40
0,6 ²	-3*	-4	-3**	-3	-3	-3	+3	+2
2	-5***	-7**	-7***	-7***	-4**	-7***	+4	+4
6	-17***	-16***	-21***	-13***	-17***	-14***	+4	+6

Доза (мг/кг/доза)	День 27 ¹		День 55 ¹		День 90 ¹		День 119 ¹ (восстановление)	
	M	F	M	F	M	F	M	F
Hgb (г/дл)								
0	13,5	13,0	13,8	13,6	12,5	12,2	13,1	12,2
0,6	-1,0	-0,9	-1,0**	-1,4*	-1,2*	-1,3**	+0,7	+0,9
2	-1,3***	-2,6***	-3,0***	-3,5***	-	-	+1,1	+1,3
					2,4***	3,0***		
6	-5,9***	-5,7***	-7,2***	-5,6***	-	-	+0,9	+1,6
					6,2***	5,6***		

¹Образцы были взяты через 5 дней после 4-й, 8-й и 13-й доз, а также на 119-й день у восстанавливающихся животных.

²Изменения представляют собой значения по сравнению с параллельными контролями, при этом данные, вероятно, могут быть более точными и иметь большую статистическую значимость (меньшая группа), если выразить их как изменения для отдельных животных, т. е. изменения по сравнению с уровнями до введения дозы.

* $p < 0,05$ по сравнению с параллельным контролем. ** $p < 0,01$ по сравнению с параллельным контролем. *** $p < 0,001$ по сравнению с параллельным контролем.

[00334] В том же исследовании соединение А вызывало значительные изменения вторичных гематологических показателей, как показано на фигуре 3. Дозозависимое снижение МСНС и МСН соответствует ожидаемым реологическим изменениям эритроцитов, связанным с эритропозом, ограниченном железом. Через 35 дней после прекращения введения препарата гематологические показатели были сходны с контрольными показателями.

[00335] Во время лечения также наблюдали повышение общего билирубина (tBili) при дозе ≥ 2 мг/кг/день, связанное с разрушением эритроцитов, ассоциированным с железодефицитной анемией (фигура 4) и, как считается, ассоциированным с преимущественным разрушением самых молодых эритроидных клеток — ретикулоцитов (Robinson & Koepfel, 1971). В соответствии с ожидаемой индукцией железодефицитной анемии, вызванной соединением А, значительное повышение уровней тромбоцитов наблюдали при самой высокой исследуемой дозе 6 мг/кг/доза как у самцов, так и у самок животных (фигура 5). После прекращения введения препарата

во временной точке периода восстановления уровни билирубина вернулись к нормальным значениям, а уровни тромбоцитов восстановились и оказались в пределах нормы (по сравнению с параллельным контролем).

ПРИМЕР 7

Исследование фазы 2 применения соединения А у пациентов с истинной полицитемией, требующей проведения кровопусканий

[00336] Актуальность. Пациентов с истинной полицитемией (PV) обычно лечат с помощью периодических терапевтических кровопусканий (с или без сопутствующей циторедуктивной терапией) для поддержания гематокрита $<45\%$. Следовательно, у пациентов с PV с повышенными потребностями в проведении кровопусканий, по всей вероятности, гематокрит $>45\%$ в промежутках между процедурами. С другой стороны, у большинства пациентов с PV при постановке диагноза имеется дефицит железа, усиливающийся после повторных кровопусканий. У пациентов с PV могут наблюдаться симптомы дефицита железа (с когнитивными нарушениями и усталостью даже при отсутствии анемии), а прием добавки железа обычно приводит к увеличению числа кровопусканий. Последние исследования показывают, что доступные терапевтические средства улучшают симптомы, связанные с PV, частично за счет устранения дефицита железа. Таким образом, пациенты с симптомами PV, требующей проведения кровопусканий, представляют собой нереализованную терапевтическую потребность. Мы предполагаем, что миметики гепсидина способствуют секвестрации железа в макрофагах селезенки, снижая доступность железа для злокачественного эритропоэза, чтобы уменьшить потребность в проведении кровопусканий, и в то же время устраняя симптомы, связанные с дефицитом железа.

[00337] Соединение А является миметическим агентом гепсидина, который проходит клинические испытания для лечения различных заболеваний крови. У диких мышей повторное подкожное введение соединения А транзиторно снижало уровень сывороточного железа и вызывало дозозависимое снижение гематокрита. Исследование фазы I применения соединения А в однократной дозе у 62 здоровых субъектов показало снижение концентрации железа в сыворотке крови на 65% и

уменьшение насыщения трансферрина на 70% по сравнению с исходным уровнем, без существенных нежелательных явлений.

[00338] Цели. Первичные цели этого клинического исследования фазы 2, состоящего из 3 частей (представленного на фигуре 6), заключались в демонстрации эффективности (снижение потребности в проведении кровопусканий) и безопасности соединения А для пациентов с PV, требующей проведения кровопусканий. Вторичные цели заключались в определении влияния соединения А на результаты лечения по отзывам пациентов и на показатели метаболизма железа.

[00339] Способы. Критерии отбора включали в себя установленный диагноз PV (по критериям ВОЗ 2016 г.) и ≥ 3 кровопусканий для достижения гематокрита $\leq 45\%$ в течение 6 месяцев до включения в исследование с или без стабильной дозы циторедуктивной терапии. Пациенты, соответствующие критериям участия, были включены в 28-недельную часть исследования фазы 2, в которой подбирали дозу. Пациенты получали соединение А в дозах 10, 20, 40, 60 и 80 мг, вводимых подкожно еженедельно с индивидуальным подбором доз для поддержания гематокрита $< 45\%$, как показано на фигуре 7. Показатели железа в организме определяли путем мониторинга сывороточного ферритина, сывороточного железа, насыщения трансферрина (TSAT), среднего объема эритроцита (MCV) и среднего содержания гемоглобина в эритроците (MCH).

[00340] Результаты. Данные об эффективности были получены для 13 субъектов, включенных в исследование: 7/13 с низким риском PV и 6/13 с высоким риском PV; средний возраст 57,4 года (диапазон 31–74); шестерым проводили только ТР, 6 — совместно с гидроксимочевинной и 1 — совместно с интерфероном; ТР в течение 24 недель до включения в исследование = 3–9; медиана времени между ТР = 42 дня. Характеристики пациентов представлены в таблице 9.

Таблица 9. Субъекты, включенные в исследование соединения А.

Субъект	Возраст/пол	Категория риска	Скрининг НСТ, WBC, PLT	Аллель (%)	Предварительная циторедуктивная терапия?	Сопутствующая циторедуктивная терапия?	Количество PHL до применения соединения А	Макс. число недель между PHL	Число недель без PHL после введения 1-й дозы соединения А	Диапазон доз соединения А
3	64 / М	Н	42,3%, 4,3 10 ⁹ /л, 234 10 ⁹ /л	52	У (НУ)	У (НУ 1500 мг)	3	15	26	10, 20, 10
5	52 / М	Л	45,8%, 12,8 10 ⁹ /л, 534 10 ⁹ /л	77,7	--	Н	3	9	23	10, 20, 40, 80
1	58 / F	Л	41,6%, 12,1 10 ⁹ /л, 993 10 ⁹ /л	54,7	--	Н	5	11	37 (PHV@W31 т. е. после рандомизации)	10, 20, 40, 80, 40, 60, 40
2	71 / М	Н	43,6%, 6,7 10 ⁹ /л, 536 10 ⁹ /л	36,1	--	Н	4	10	37	10, 20, 40, 20, 40

Субъект	Возраст/пол	Категория риска	Скрининг HCT, WBC, PLT	Аллель (%)	Предварительная циторедуктивная терапия?	Сопутствующая циторедуктивная терапия?	Количество PHL до применения соединения А	Макс. число недель между PHL	Число недель без PHL после введения 1-й дозы соединения А	Диапазон доз соединения А
4	43 / М	L	45,2%, 15,8 10 ⁹ /л, 796 10 ⁹ /л	78,4	HU прекращена в 2013 г.	N	9	10	24 (PHB@W12)	20, 40, 80, 60
9	31 / М	L	43,9%, 5,6 10 ⁹ /л, 330 10 ⁹ /л		--	N	6	11	6	20, 40
6	68 / F	H	40,7%, 7,48 тыс/мкл, 579 тыс/мкл	16,6	Y (HU)	Y (HU 500 мг)	3	8	14	20, 40, 80, 40
7	74 / F	H	41%, 8,68 тыс/мкл, 140 тыс/мкл	53,7	Y (HU)	Y (HU 1500 мг)	4	21	12	20, 40

Субъект	Возраст/ пол	Категория риска	Скрининг HCT, WBC, PLT	Аллель (%)	Предварительная циторедуктивная терапия?	Сопутствующая циторедуктивная терапия?	Количество PHL до применения соединения А	Макс. число недель между PHL	Число недель без PHL после введения 1-й дозы соединения А	Диапазон доз соединения А
10	61 / М	Н	42,1%, 5,32 тыс/мкл, 637 тыс/мкл	34,5	Y (IFN)	Y (Интерферон 180 мкг раз/неделю)	6	13	1	20, 40
12	50 / М	L	44,8%, 5,86 тыс/мкл, 307 тыс/мкл		Y (IFN)	Y (Интерферон)	4	21	12	20
13	56 / М	L	42,4%, 19,82 тыс/мкл, 328 тыс/мкл		--	N	6	13	1	20
11	52 / F	L	38,5%, 4,1 тыс/мм ³ , 351 тыс/мм ³	32,3	Y (IFN)	Y (Интерферон 45 мкг)	6	8	3	20

Субъект	Возраст/ пол	Категория риска	Скрининг HCT, WBC, PLT	Аллель (%)	Предварительная циторедуктивная терапия?	Сопутствующая циторедуктивная терапия?	Количество PHL до применения соединения А	Макс. число недель между PHL	Число недель без PHL после введения 1-й дозы соединения А	Диапазон доз соединения А
8	66 / F	H	45,9%, 8,3 тыс/мкл, 240 тыс/мкл	61,9	HU прекратили >2 лет назад	N	5	7	10	20, 40, 20

Сокращения: F = женский, H = высокий, HCT = гематокрит, HU = гидроксимочевина, L = низкий, M = мужской, N = нет, PHB = кровопускание(и), PLT = тромбоциты, WBC = количество лейкоцитов, Y = да.

[00341] Всем субъектам поддерживали гематокрит $<45\%$ после соответствующей корректировки дозы. Средние исходные значения составили: ферритин сыворотки = 14,2 нг/мл (5, 37); сывороточное железо = 33,0 мкг/дл (16,8, 107,8); TSAT = 7,6% (4, 30). Во время лечения соединением А уровни сывороточного ферритина постепенно повышались до нормального (фигура 8), что указывает на увеличение запасов железа. Показатели TSAT (фигура 9) и сывороточного железа менялись транзиторно, но оставались ниже нормы, что отражает фармакодинамический эффект соединения А, заключающийся в ингибировании высвобождения железа из внутриклеточных запасов. Это было связано с увеличением MCV (фигура 10) и MCH (фигура 11), а также снижением гематокрита и количества эритроцитов, что свидетельствует о нормализации распределения железа.

[00342] Восемь субъектов принимали соединение А в течение ≥ 3 месяцев (фигура 7). Трое субъектов были рандомизированы. Во время открытого этапа исследования, в ходе которого подбиралась доза, всем субъектам не проводились кровопускания, за исключением одного субъекта, который не соответствовал требованиям лечения и пропустил запланированный курс лечения между 4-й и 9-й неделями, и ему провели кровопускание примерно на 13-й неделе. Трое субъектов завершили часть 1 (28 недель) без ТР в отличие от 3–5 ТР, в которых они нуждались за аналогичный период до начала исследования. В течение 28-недельного периода подбора дозы гематокрит постоянно контролировали на уровне ниже 45% у всех субъектов, за исключением двух (фигура 12). У двух субъектов гематокрит транзиторно превышал 45%, но оставался ниже 45% после проведения кровопускания у одного и повышения дозы у обоих. Кроме того, количество эритроцитов уменьшилось (фигура 13), а MCV увеличилось у всех субъектов, за исключением двух. Эти данные свидетельствуют о перераспределении железа в процессе эритропоэза. Наконец, до начала лечения средние показатели, связанные с железом, соответствовали системному дефициту железа, а сывороточный ферритин постепенно увеличивался до нормального уровня. Наиболее частыми нежелательными явлениями были реакции в месте инъекции (ISR), о которых сообщили трое пациентов. Большинство реакций были 1–2 класса и носили преходящий характер, и ни одному пациенту введение лекарственного средства прекращено не было.

[00343] Эти исследования показывают, что соединение А обладает хорошей переносимостью. У субъектов, соответствующих требованиям лечения,

значительно снизился гематокрит и абсолютные уровни ниже 45%, а также повысился ферритин в конце оцениваемого периода лечения по сравнению с периодом до включения в исследование, что свидетельствует об улучшении симптомов, связанных с дефицитом железа. Количество тромбоцитов у субъектов оставалось, в целом, стабильным в течение всего курса лечения (фигура 14). В течение курса лечения у субъектов наблюдалась тенденция к увеличению % ретикулоцитов (фигура 15), хотя аналогичного увеличения зрелых эритроцитов не наблюдалось (данные не показаны). Количество лейкоцитов у субъектов оставалось, в целом, стабильным в течение всего курса лечения, что говорит о том, что лечение не вызывало воспалительной реакции (фигура 16). Прогрессирования заболевания PV не наблюдалось, о чем свидетельствует отсутствие повышения уровня тромбоцитов и лейкоцитов.

[00344] Концентрации соединения А в плазме крови пациентов с PV измеряли в различные сроки после подкожного введения доз от 10 мг до 80 мг. Концентрации увеличивались в зависимости от дозы и варьировались в зависимости от дозы и времени взятия образцов. Концентрации соединения А варьировались от ниже обнаруживаемых (< 2 нг/мл) до 866 нг/мл (фигуры 17А и 17В).

[00345] Выводы. Полученные результаты оправдывают применение миметиков гепсидина, таких как соединение А, для лечения пациентов с PV, в том числе пациентов с низким риском PV, с повышенной потребностью в проведении терапевтических кровопусканий. Предполагается, что соединение А и другие аналоги гепсидина способствуют секвестрации железа в макрофагах селезенки, снижая доступность железа для злокачественного эритропоэза, чтобы уменьшить потребность в проведении кровопусканий, и в то же время устраняя симптомы, связанные с дефицитом железа. Эти исследования показывают, что соединение А является эффективным средством для лечения PV, устраняя дефицит железа и исключая необходимость ТР у пациентов с PV. Устранение потребности в ТР в течение 7 месяцев у пациентов с PV, требующей проведения ТР, является существенным и непредвиденным. Данные результаты показывают, что соединение А является эффективным средством для контроля гематокрита, устранения дефицита железа и отказа от проведения терапевтических кровопусканий у пациентов как с низким, так и высоким риском. Эти результаты также устанавливают режимы дозирования, способ введения, а также способы мониторинга и корректировки дозирования на протяжении

всего курса лечения.

[00346] Все вышеуказанные патенты США, публикации заявок на патенты США, заявки на патенты США, иностранные патенты, заявки на иностранные патенты и непатентные публикации, упомянутые в настоящем описании и/или перечисленные в информационном листке заявки, включены в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[00347] Из вышесказанного следует, что, хотя конкретные варианты осуществления изобретения были описаны в настоящем документе в целях иллюстрации, различные модификации могут быть внесены без отклонения от сущности и объема изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Утверждается следующее:

1. Способ лечения истинной полицитемии у нуждающегося в этом субъекта, включающий в себя введение субъекту эффективного количества аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата, причем аналог гепсидина содержит пептид, содержащий или состоящий из формулы I:

R1-X-Y-R2 (I) (SEQ ID NO: 1),

где

R1 представлен водородом, C1-C6-алкилом, C6-C12-арилом, C1-C20-алканоилом или pGlu;

R2 представлен NH₂ или OH;

X представлен пептидной последовательностью, имеющей формулу II

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 (II) (SEQ ID NO:2),

где

X1 представлен Asp, Ala, Ida, pGlu, bhAsp, Leu, D-Asp или отсутствует;

X2 представлен Thr, Ala или D-Thr;

X3 представлен His, Lys или D-His;

X4 представлен Phe, Ala, Dpa или D-Phe;

X5 представлен Pro, Gly, Arg, Lys, Ala, D-Pro или bhPro;

X6 представлен Ile, Cys, Arg, Lys, D-Ile или D-Cys;

X7 представлен Cys, Ile, Leu, Val, Phe, D-Ile или D-Cys;

X8 представлен Ile, Arg, Phe, Gln, Lys, Glu, Val, Leu или D-Ile;

X9 представлен Phe или bhPhe; и

X10 представлен Lys, Phe или отсутствует;

в которой, при отсутствии Y, X7 представлен Ile; и

Y представлен пептидной последовательностью, имеющей формулу III

Y1-Y2-Y3-Y4-Y5-Y6-Y7-Y8-Y9-Y10-Y11-Y12-Y13-Y14-Y15 (III) (SEQ ID NO:3),

где

Y1 представлен Gly, Cys, Ala, Phe, Pro, Glu, Lys, D-Pro, Val, Ser или отсутствует;

Y2 представлен Pro, Ala, Cys, Gly или отсутствует;

Y3 представлен Arg, Lys, Pro, Gly, His, Ala, Trp или отсутствует;

Y4 представлен Ser, Arg, Gly, Trp, Ala, His, Tyr или отсутствует;

Y5 представлен Lys, Met, Arg, Ala или отсутствует;

Y6 представлен Gly, Ser, Lys, Ile, Ala, Pro, Val или отсутствует;

Y7 представлен Trp, Lys, Gly, Ala, Ile, Val или отсутствует;

Y8 представлен Val, Thr, Gly, Cys, Met, Tyr, Ala, Glu, Lys, Asp, Arg или отсутствует;

Y9 представлен Cys, Tyr или отсутствует;

Y10 представлен Met, Lys, Arg, Tyr или отсутствует;

Y11 представлен Arg, Met, Cys, Lys или отсутствует;

Y12 представлен Arg, Lys, Ala или отсутствует;

Y13 представлен Arg, Cys, Lys, Val или отсутствует;

Y14 представлен Arg, Lys, Pro, Cys, Thr или отсутствует; и

Y15 представлен Thr, Arg или отсутствует;

причем указанный пептид, содержащий или состоящий из формулы I, в качестве варианта, пегилирован на R1, X или Y, и

при этом боковая цепь аминокислоты пептида, в качестве варианта, конъюгирована с липофильным заместителем или полимерным фрагментом.

2. Способ по п. 1, где R1 представлен водородом, изовалериановой кислотой, изомасляной кислотой или ацетилом.

3. Способ по п. 1, где X представлен пептидной последовательностью, имеющей формулу IV

X1-Thr-His-X4-X5-X6-X7-X8-Phe-X10 (IV) (SEQ ID NO:4),

где

X1 представлен Asp, Ida, pGlu, bhAsp или отсутствует;

X4 представлен Phe или Dpa;

X5 представлен Pro или bhPro;

X6 представлен Ile, Cys или Arg;

X7 представлен Cys, Ile, Leu или Val;

X8 представлен Ile, Lys, Glu, Phe, Gln или Arg; и

X10 представлен Lys или отсутствует.

4. Способ по любому из пп. 1–2, в котором X представлен пептидной последовательностью, имеющей формулу V:

X1-Thr-His-X4-X5-Cys-Ile-X8-Phe-X10 (V) (SEQ ID NO:5),

где

X1 представлен Asp, Ida, pGlu, bhAsp или отсутствует;

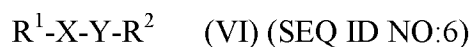
X4 представлен Phe или Dpa;

X5 представлен Pro или bhPro;

X8 представлен Ile, Lys, Glu, Phe, Gln или Arg; и

X10 представлен Lys или отсутствует.

5. Способ по п. 1, в котором пептид соответствует формуле VI:

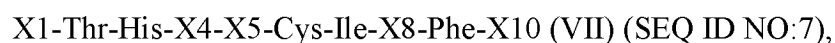


или ее фармацевтически приемлемой соли, где:

R^1 представлен водородом, изовалериановой кислотой, изомасляной кислотой или ацетилом;

R^2 представлен $-NH_2$ или $-OH$;

X представлен пептидной последовательностью, имеющей формулу VII:



где

X1 представлен Asp, Ida, pGlu, bhAsp или отсутствует;

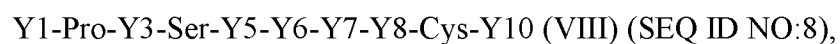
X4 представлен Phe или Dpa;

X5 представлен Pro или bhPro;

X8 представлен Ile, Lys, Glu, Phe, Gln или Arg; и

X10 представлен Lys или отсутствует;

где Y представлен пептидной последовательностью, имеющей формулу VIII:



где

Y1 представлен Gly, Glu, Val или Lys;

Y3 представлен Arg или Lys;

Y5 представлен Arg или Lys;

Y6 представлен Gly, Ser, Lys, Ile или Arg;

Y7 представлен Trp или отсутствует;

Y8 представлен Val, Thr, Asp, Glu или отсутствует; и

Y10 представлен Lys или отсутствует;

причем пептид имеет дисульфидную связь между двумя Cys;

при этом указанный пептид формулы I, в качестве варианта, пегилирован на R¹, X или Y;

причем боковая цепь аминокислоты пептида, в качестве варианта, конъюгирована с липофильным заместителем или полимерным фрагментом; и

при этом Ida представлен иминодиуксусной кислотой; pGlu представлен пироглутаминовой кислотой; bhAsp представлен β-гомоаспарагиновой кислотой; и bhPro представлен β-гомопролином.

6. Способ по любому из пп. 1–2, в котором пептид содержит одну из следующих последовательностей:

DTHFPICIFGPRSKGWVC (SEQ ID NO:9);

DTHFPCIFGPRSKGWVCK (SEQ ID NO:10);

DTHFPCIFEPGRSKGWVCK (SEQ ID NO:11);

DTHFPCIFGPRSKGWACK (SEQ ID NO:12);

DTHFPCIFGPRSKGWVCKK (SEQ ID NO:13);

DTHFPCIFVCHRPKGCYRRVCR (SEQ ID NO:14);

DTHFPCIKFGPRSKGWVCK (SEQ ID NO:15);

DTHFPCIKFKPRSKGWVCK (SEQ ID NO:16);

DTHFPCIFGPRSRGWVCK (SEQ ID NO:17);

DTHFPCIKFGPKSKGWVCK (SEQ ID NO:18);

DTHFPCIKFEPRSKGCK (SEQ ID NO:19);

DTHFPCIKFEPKSKGWECK (SEQ ID NO:20);

DTHFPCIKFEPRSKKCK (SEQ ID NO:21);

DTHFPCIKFEPRSKGCKK (SEQ ID NO:22);

DTHFPCIKFKPRSKGCK (SEQ ID NO:23);

DTHFPCIKFEPKSKGCK (SEQ ID NO:24);

DTHFPCIKF (SEQ ID NO:25);

DTHFPCIF (SEQ ID NO:26) или

DTKFPCIF (SEQ ID NO:27),

причем указанный пептид, в качестве варианта, пегилирован на R1, X или Y, и при этом боковая цепь аминокислоты пептида, в качестве варианта, конъюгирована с липофильным заместителем или полимерным фрагментом.

7. Способ по любому из пп. 1–2, в котором аналог гепсидина содержит одну из следующих последовательностей:

изовалериановая кислота-DTHFPICIFGPRSKGWVC-NH₂ (SEQ ID NO:9);

изовалериановая кислота-DTHFPCIFGPRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:10);

изовалериановая кислота-DTHFPCIFFEPRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:11);

изовалериановая кислота-DTHFPCIFGPRSKGWACK-NH₂ (SEQ ID NO:12);

изовалериановая кислота-DTHFPCIFGPRSKGWVCKK-NH₂ (SEQ ID NO:13);

изовалериановая кислота-DTHFPCIFVCHRPKGCYRRVCR-NH₂ (SEQ ID NO:14);

изовалериановая кислота-DTHFPCI(K(PEG8))FGPRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:28);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKF(K(PEG8))PRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:16);

изовалериановая кислота-DTHFPICIFGPRS(K(PEG8))GWVC-NH₂ (SEQ ID NO:29);

изовалериановая кислота-DTHFPICIFGPRS(K(PEG4))GWVC-NH₂ (SEQ ID NO:30);

изовалериановая кислота-DTHFPCIIFGPRSRGWVC(K(PEG8))-NH₂ (SEQ ID NO:31);

изовалериановая кислота-DTHFPCIIFGPRSRGWVC(K(PEG4))-NH₂ (SEQ ID NO:32);

изовалериановая кислота-DTHFPCIIFGPRSRGWVC(K(PEG2))-NH₂ (SEQ ID NO:33);

изовалериановая кислота-DTHFPCI(K(Palm))FGPRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:34);

изовалериановая кислота-DTHFPCI(K(Palm))PRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:35);

изовалериановая кислота-DTHFPCI(K(Palm))SKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:36);

изовалериановая кислота-DTHFPCI(K(Palm))GWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:37);

изовалериановая кислота-DTHFPCI(K(Palm))FGPRSKGWVC(K(Palm))NH₂ (SEQ ID NO:38);

изовалериановая кислота-DTHFPCI(K(PEG3-Palm))FGPRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:39);

изовалериановая кислота-DTHFPCI(K(PEG3-Palm))PRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:40);

изовалериановая кислота-DTHFPCI(K(PEG3-Palm))SKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:41);

изовалериановая кислота-DTHFPCI(K(PEG3-Palm))GWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:42);

изовалериановая кислота-DTHFPCI(K(PEG3-Palm))FGPRSKGWVC(K(PEG3-Palm))-NH₂ (SEQ ID NO:43);

изовалериановая кислота-DTHFPCI(K(PEG3-Palm))FGPRSKGWVC(K(PEG8))-NH₂ (SEQ ID NO:44);

изовалериановая кислота-DTHFPCI(K(isoGlu-Palm))FEPRSKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:45);

изовалериановая кислота-DTHFPCI(K(isoGlu-Palm))PRSKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:46);

изовалериановая кислота-DTHFPCI(K(isoGlu-Palm))SKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:47);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKFEP(K(isoGlu-Palm))SKGWECK-NH₂ (SEQ ID NO:20);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKFEPRS(K(isoGlu-Palm))GCK-NH₂(SEQ ID NO:48);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKFEPRSK(K(isoGlu-Palm))CK-NH₂ (SEQ ID NO:21);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKFEPRSKGCK(K(isoGlu-Palm))-NH₂ (SEQ ID NO:49);

изовалериановая кислота-DTHFPCI-K(Dapa-Palm)-FEPRSKGCK-NH₂(SEQ ID NO:50);

изовалериановая кислота-DTHFPCIK(F(Dapa-Palm))PRSKGCK-NH₂(SEQ ID NO:23);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKFEP(K(Dapa-Palm))SKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:24);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKFEPRS(K(Dapa-Palm))GCK-NH₂(SEQ ID NO:51);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKFEPRSK(K(Dapa-Palm))CK-NH₂(SEQ ID NO:52);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKFEPRSKGC(K(Dapa-Palm))K-NH₂ (SEQ ID NO:53);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKFEPRSKGC(K(Dapa-Palm))-NH₂ (SEQ ID NO:54);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKF(K(PEG11-Palm))PRSK[Sar]CK-NH₂ (SEQ ID NO:55);

изовалериановая кислота-DTHFPCIKF-NH₂ (SEQ ID NO:25);

Hy-DTHFPCIKF-NH₂ (SEQ ID NO:25);

изовалериановая кислота-DTHFPCIIF-NH₂ (SEQ ID NO:26);

Hy-DTHFPCIIF-NH₂ (SEQ ID NO:26);

изовалериановая кислота-DTKFPCIIF-NH₂ (SEQ ID NO:27) или

Hy-DTKFPCIIF-NH₂ (SEQ ID NO:27).

8. Способ по любому из пп. 1–2, в котором аналог гепсидина представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIIFGPRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:10) или ее фармацевтически приемлемую соль.

9. Способ по любому из пп. 1–2, в котором аналог гепсидина представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIIFEPGRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:11) или ее фармацевтически приемлемую соль.

10. Способ по любому из пп. 1–2, в котором аналог гепсидина представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCI(K(PEG8))FGPRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:28) или ее фармацевтически приемлемую соль.

11. Способ по любому из пп. 1–2, в котором аналог гепсидина представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKF(K(PEG8))PRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:16) или ее фармацевтически приемлемую соль.

12. Способ по любому из пп. 1–2, в котором аналог гепсидина представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIIFGPRSRGWVC(K(PEG8))-NH₂ (SEQ ID NO:31) или ее фармацевтически приемлемую соль.

13. Способ по любому из пп. 1–2, в котором аналог гепсидина представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCI(K(Palm))FGPRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:34) или ее фармацевтически приемлемую соль.

14. Способ по любому из пп. 1–2, в котором аналог гепсидина представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKF(K(Palm))PRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:35) или ее фармацевтически приемлемую соль.

15. Способ по любому из пп. 1–2, в котором аналог гепсидина представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKFGP(K(Palm))SKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:36) или ее фармацевтически приемлемую соль.

16. Способ по любому из пп. 1–2, в котором аналог гепсидина представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKFGPRSKGWVC(K(Palm))-NH₂ (SEQ ID NO:38) или ее фармацевтически приемлемую соль.

17. Способ по любому из пп. 1–2, в котором аналог гепсидина представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCI(K(PEG3-Palm))FGPRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:39) или ее фармацевтически приемлемую соль.

18. Способ по любому из пп. 1–2, в котором аналог гепсидина представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKF(K(PEG3-Palm))PRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:40) или ее фармацевтически приемлемую соль.

19. Способ по любому из пп. 1–2, в котором аналог гепсидина представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKFGP(K(PEG3-Palm))SKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:41) или ее фармацевтически приемлемую соль.

20. Способ по любому из пп. 1–2, в котором аналог гепсидина представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKFGPRS(K(PEG3-Palm))GWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:42) или ее фармацевтически приемлемую соль.

21. Способ по любому из пп. 1–2, в котором аналог гепсидина представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKFGPRSKGWVC(K(PEG3-Palm))-NH₂ (SEQ ID NO:43) или ее фармацевтически приемлемую соль.

22. Способ по любому из пп. 1–2, в котором аналог гепсидина представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKFGPRSKGWVC(K(PEG8))-NH₂ (SEQ ID NO:44) или ее фармацевтически приемлемую соль.

23. Способ по любому из пп. 1–2, в котором аналог гепсидина представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCI(K(isoGlu-Palm))FEPRSKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:45) или ее фармацевтически приемлемую соль.

24. Способ по любому из пп. 1–2, в котором аналог гепсидина представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKF(K(isoGlu-Palm))PRSKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:46) или ее фармацевтически приемлемую соль.

25. Способ по любому из пп. 1–2, в котором аналог гепсидина представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKFEP(K(isoGlu-Palm))SKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:47) или ее фармацевтически приемлемую соль.

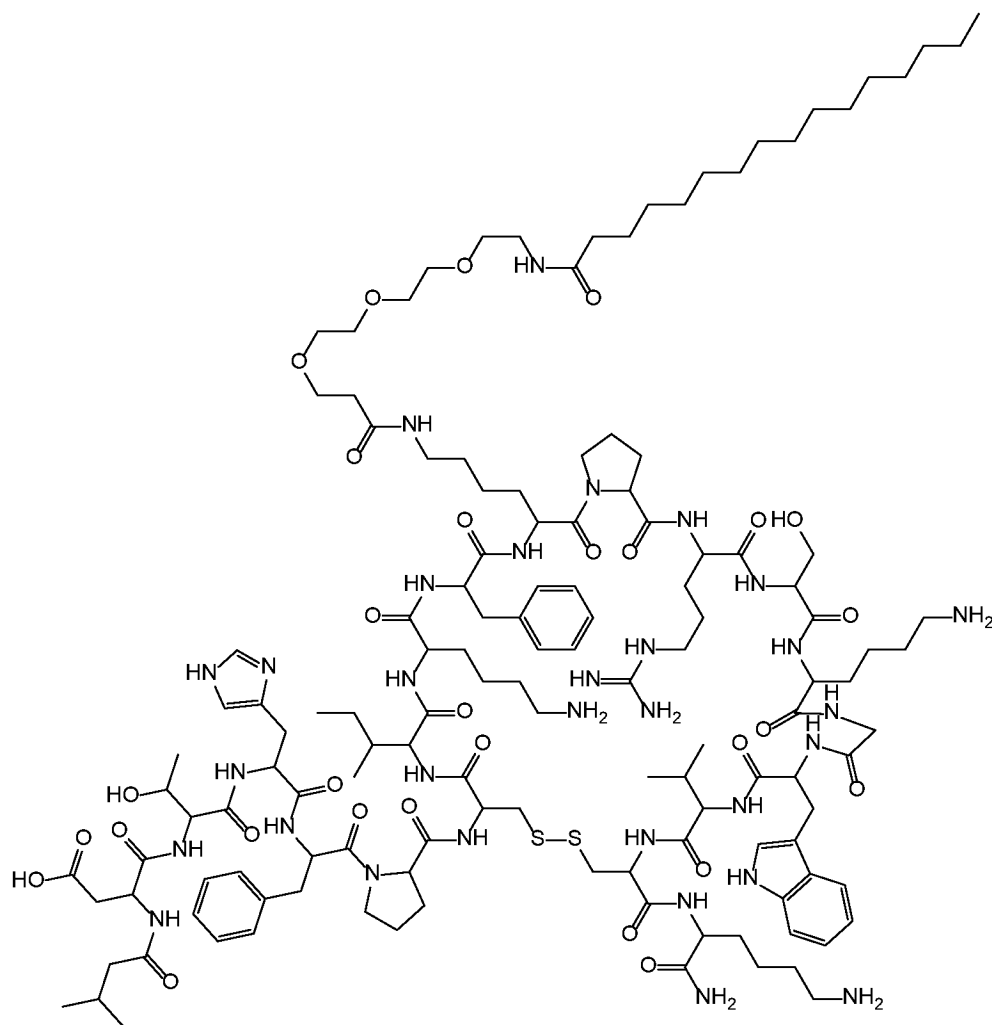
26. Способ по любому из пп. 1–2, в котором аналог гепсидина представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKFEP(R(K(isoGlu-Palm)))GCK-NH₂(SEQ ID NO:48) или ее фармацевтически приемлемую соль.

27. Способ по любому из пп. 1–2, в котором аналог гепсидина представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCI(K(Dapa-Palm))FEP(RSKGCK-NH₂) (SEQ ID NO:50) или ее фармацевтически приемлемую соль.

28. Способ по любому из пп. 1–2, в котором аналог гепсидина представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKFEP(R(K(Dapa-Palm)))SKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:24) или ее фармацевтически приемлемую соль.

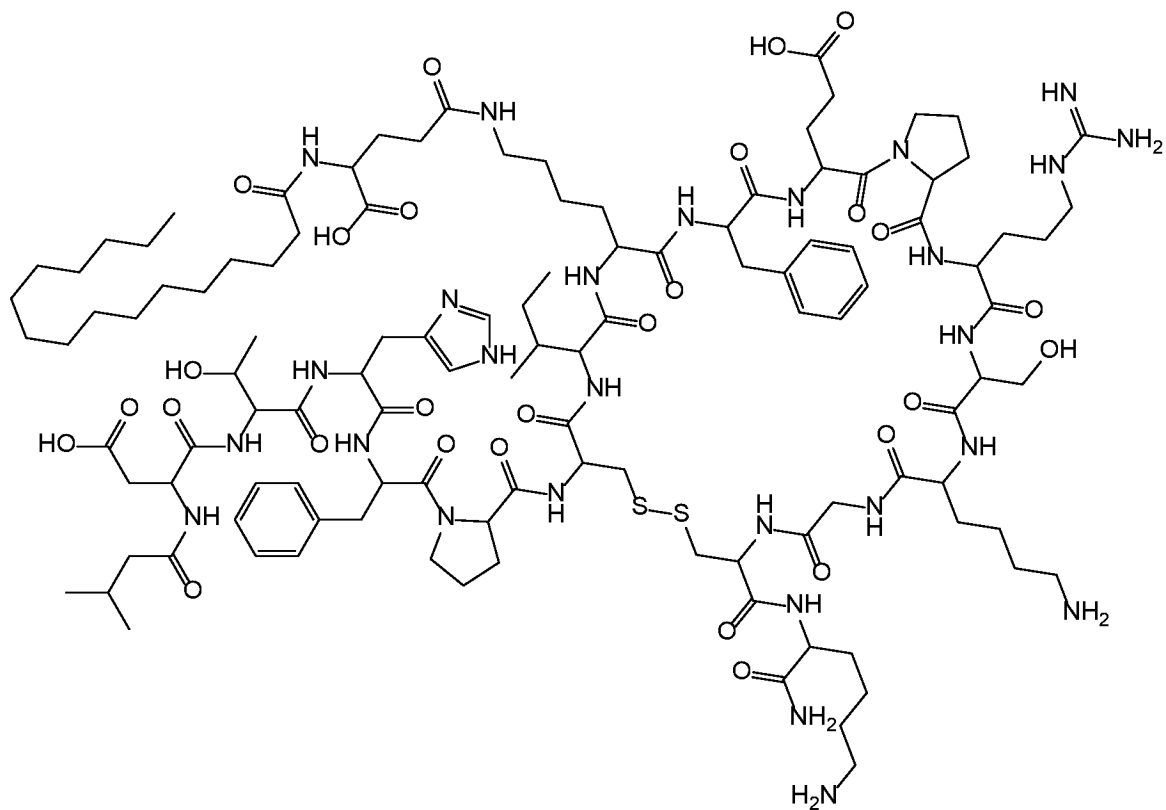
29. Способ по любому из пп. 1–2, в котором аналог гепсидина выбран из группы, состоящей из:

(a)



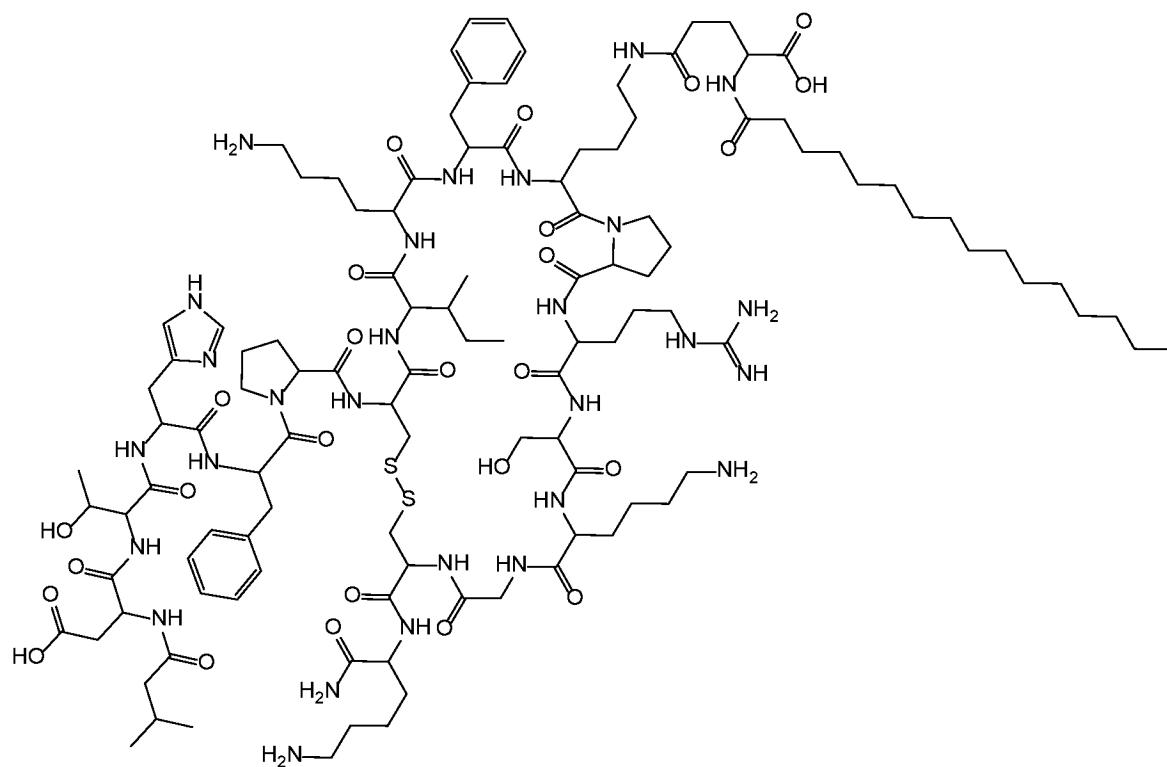
изовалериановой кислоты-DTHFPCIK(K(PEG3-Palm))PRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:40);

(b)



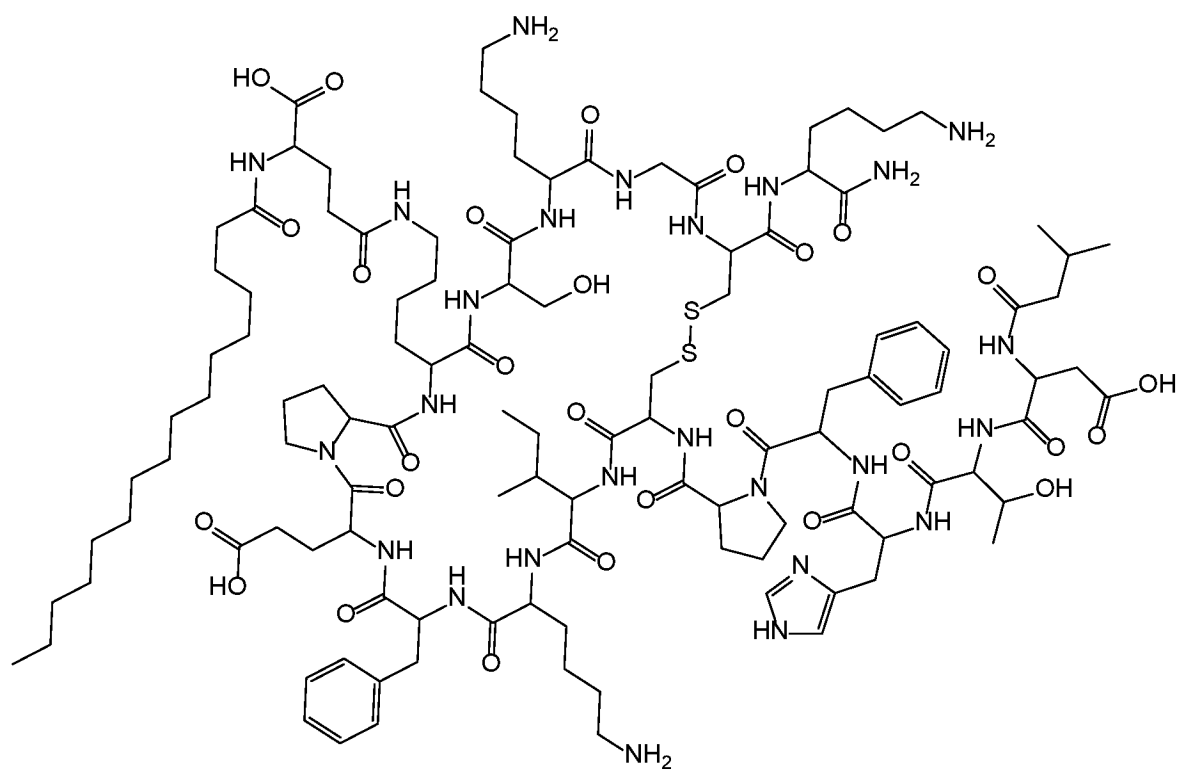
изовалериановой кислоты-DTHFPCI(K(isoGlu-Palm))FEPRSKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:45);

(c)



изовалериановой кислоты-DTHFPCIKF(K(isoGlu-Palm))PRSKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:46);

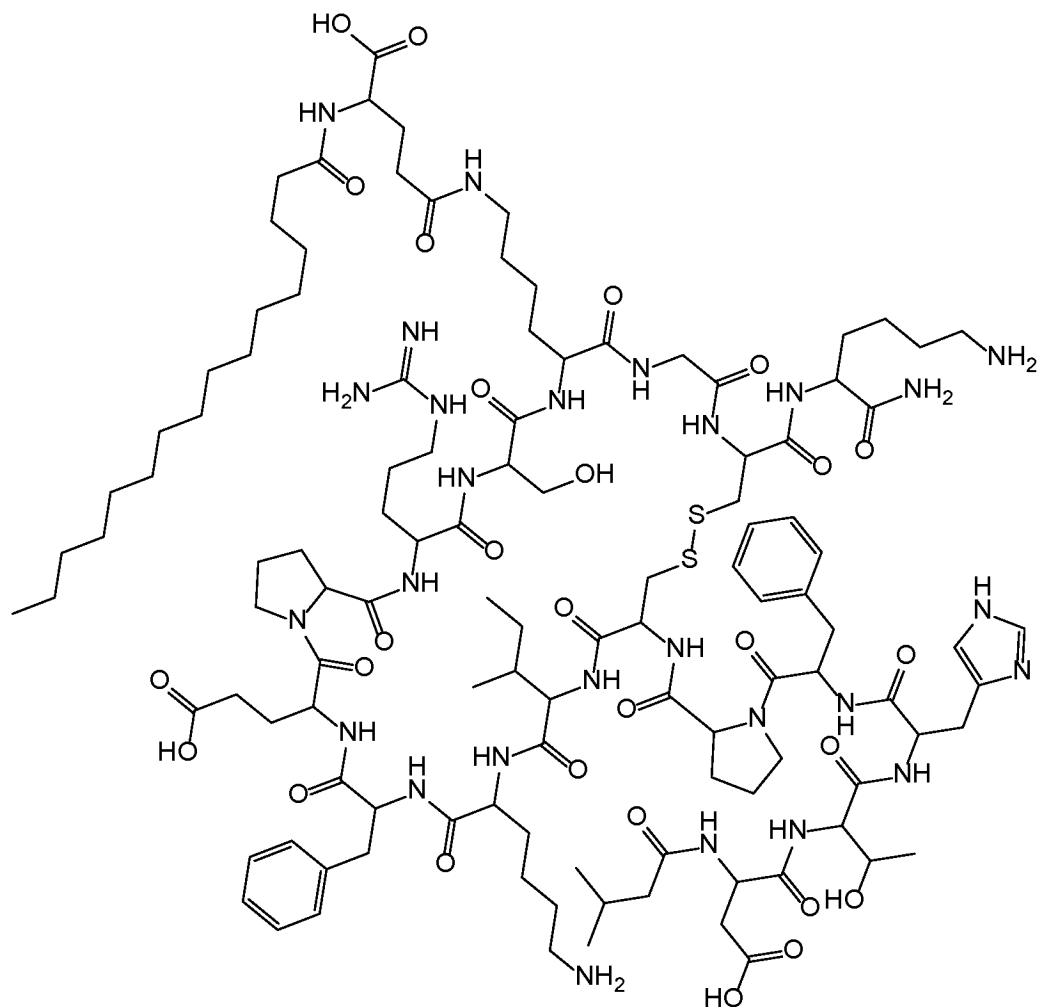
(d)



изовалериановой кислоты-DTHFPCIKFEP(K(isoGlu-Palm))SKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:47)

и

(e)



изовалериановой кислоты-DTHFPCIKFEP(RS(K(isoGlu-Palm)))GCK-NH₂ (SEQ ID NO:48),

причем аминокислоты представлены L-аминокислотами и их фармацевтически приемлемыми солями.

30. Способ по любому из пп. 1–29, в котором аналог гепсидина вводят субъекту в фармацевтической композиции, содержащей один или более фармацевтически приемлемых носителей, наполнителей или разбавителей.

31. Способ по п. 30, в котором фармацевтическую композицию вводят субъекту пероральным, внутривенным, перитонеальным, внутрикожным, подкожным, внутримышечным, интратекальным, ингаляционным, путем испарения, распыления,

подъязычным, буккальным, парентеральным, ректальным, вагинальным или местным способом введения.

32. Способ по п. 31, в котором фармацевтическую композицию вводят субъекту пероральным или подкожным способом.

33. Способ по любому из пп. 1–32, в котором аналог гепсидина или фармацевтическую композицию вводят субъекту не чаще двух раз в неделю или не чаще одного раза в неделю.

34. Способ по любому из пп. 1–33, в котором аналог гепсидина вводят субъекту в дозе от около 10 мг до около 100 мг, от около 10 мг до около 70 мг, от около 10 мг до около 60 мг, от около 20 мг до около 50 мг, от около 20 мг до около 40 мг, около 80 мг, около 70 мг, около 60 мг, около 50 мг, около 40 мг, около 30 мг, около 25 мг, около 20 мг, около 15 мг или около 10 мг.

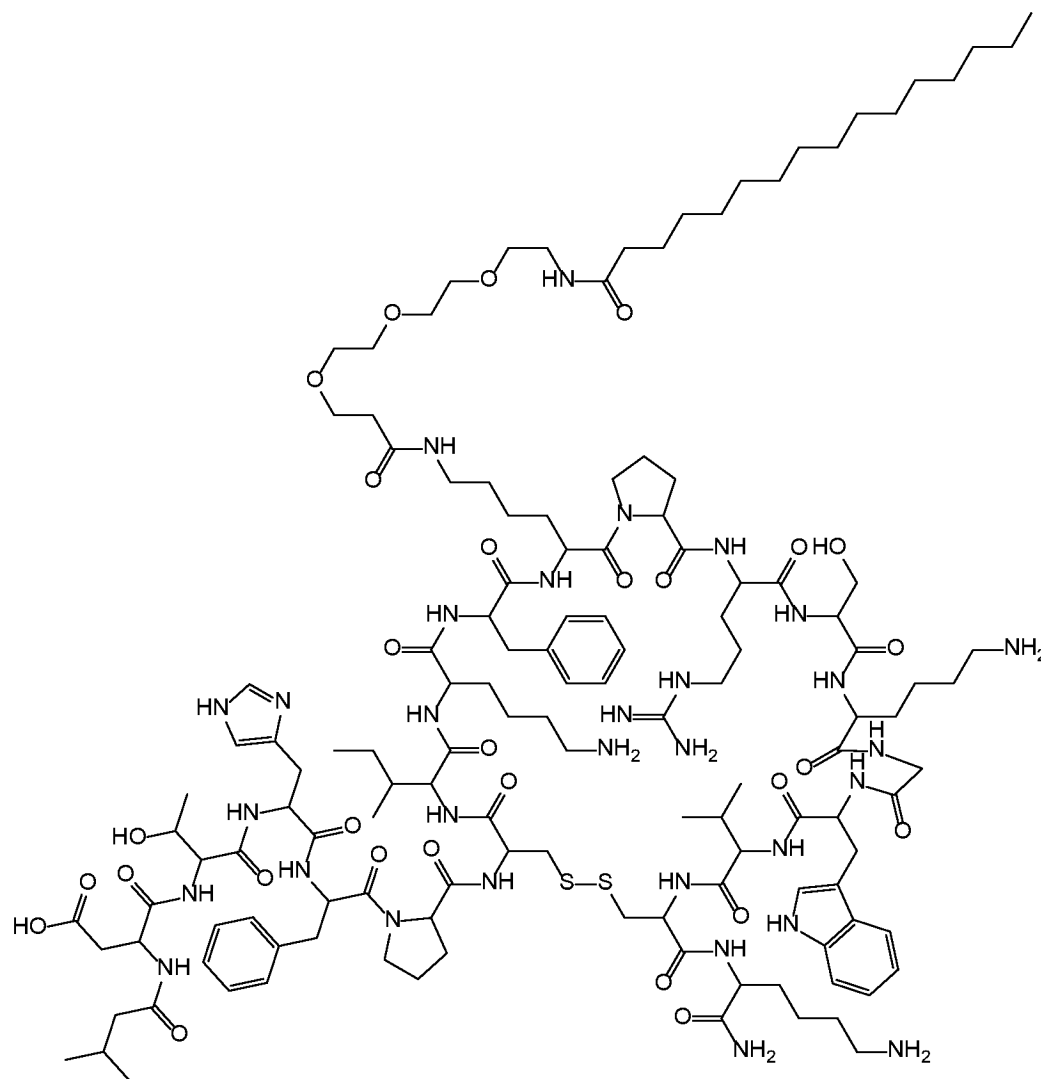
35. Способ по любому из пп. 1–33, в котором пептид или фармацевтическую композицию вводят субъекту в дозе около 10 мг, около 15 мг, около 20 мг, около 25 мг, около 30 мг, около 35 мг или около 40 мг.

36. Способ по любому из пп. 1–33, в котором пептид или фармацевтическую композицию вводят субъекту в дозе около 15 мг, около 20 мг, около 25 мг, около 30 мг или около 40 мг примерно один раз в неделю.

37. Способ по любому из пп. 1–33, в котором пептид или фармацевтическую композицию вводят субъекту в дозе около 15 мг, около 20 мг, около 25 мг, около 30 мг или около 40 мг примерно два раза в неделю.

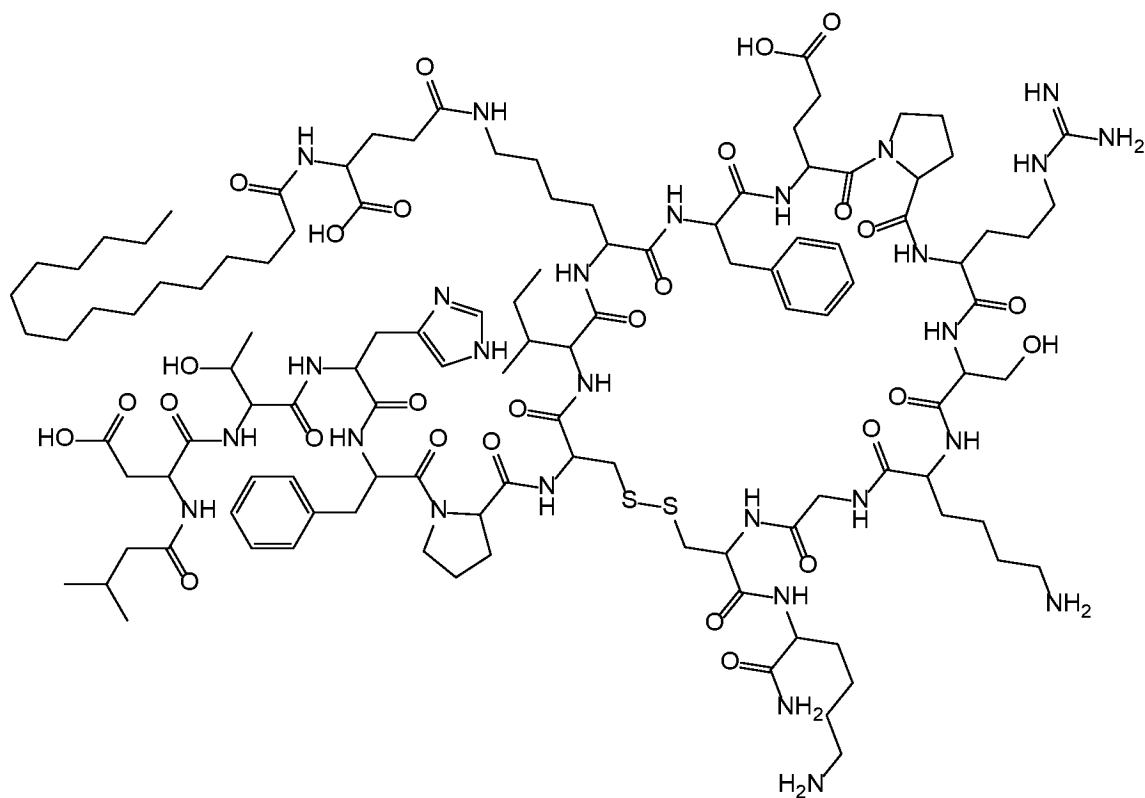
38. Способ по п. 1, включающий введение субъекту эффективного количества аналога гепсидина, причем аналог гепсидина выбран из группы, состоящей из:

(a)



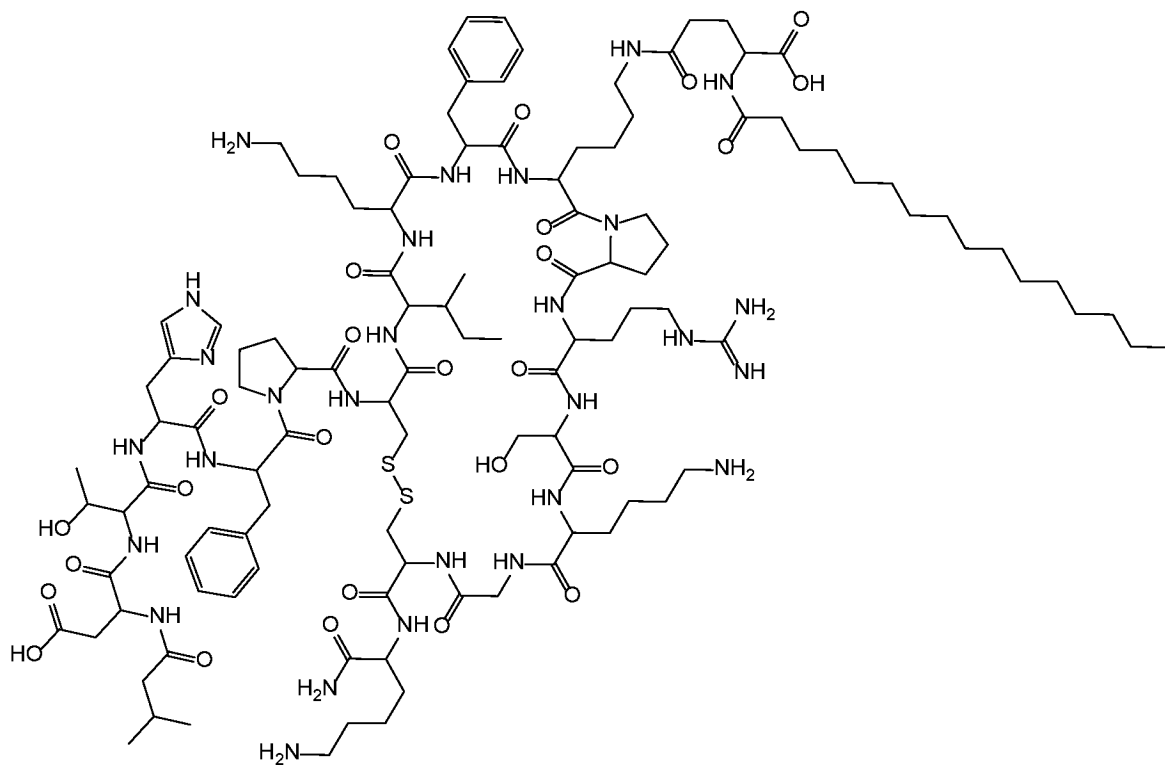
изовалериановой кислоты-DTHFPCIKF(K(PEG3-Palm))PRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:40) или ее фармацевтически приемлемой соли;

(b)



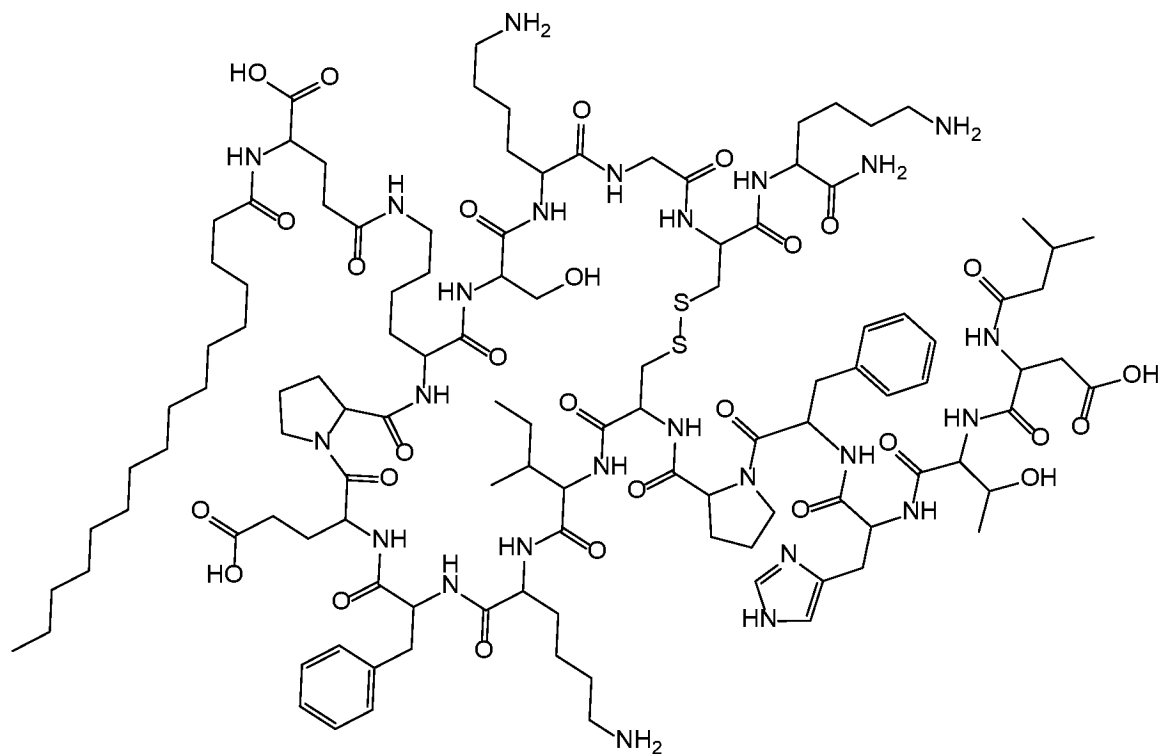
изовалериановой кислоты-DTHFPCI(K(isoGlu-Palm))FEPRSKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:45)
или ее фармацевтически приемлемой соли;

(c)



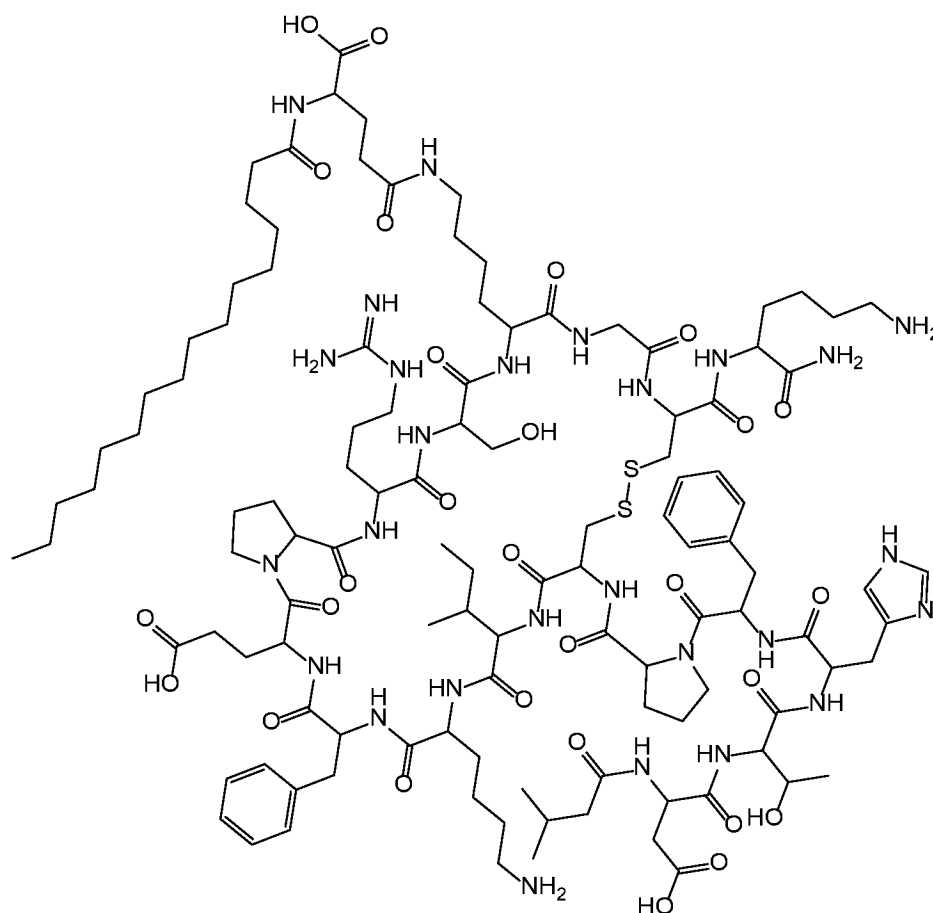
изовалериановой кислоты-DTHFPCIKF(K(isoGlu-Palm))PRSKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:46)
или ее фармацевтически приемлемой соли;

(d)



изовалериановой кислоты-DTHFPCIKFEP(K(isoGlu-Palm))SKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:47)
или ее фармацевтически приемлемой соли и

(e)



изовалериановой кислоты-DTHFPCIKFEPRS(K(isoGlu-Palm))GCK-NH₂(SEQ ID NO:48)
или ее фармацевтически приемлемой соли,

причем аминокислоты представлены L-аминокислотами;

при этом, в качестве варианта, аналог гепсидина содержит дисульфидную связь между двумя аминокислотами Cys;

причем аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе от около 5 мг до около 200 мг, около 10 мг, около 15 мг, около 20 мг, около 25 мг, около 30 мг, около 35 мг, около 40 мг, около 50 мг, около 60 мг, около 70 мг или около 80 мг примерно один раз в неделю;

при этом аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту подкожным способом введения;

причем субъект является человеком;

при этом, в качестве варианта, аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемая соль присутствует в фармацевтической композиции, дополнительно содержащей фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или разбавитель.

39. Способ по любому из пп. 1–33 или 38, в котором аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе около 10 мг.

40. Способ по любому из пп. 1–33 или 38, в котором аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе около 15 мг.

41. Способ по любому из пп. 1–33 или 38, в котором аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе около 20 мг.

42. Способ по любому из пп. 1–33 или 38, в котором аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе около 25 мг.

43. Способ по любому из пп. 1–33 или 38, в котором аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе около 30 мг.

44. Способ по любому из пп. 1–33 или 38, в котором аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе около 40 мг.

45. Способ по любому из пп. 1–33 или 38, в котором аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе около 50 мг.

46. Способ по любому из пп. 1–33 или 38, в котором аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе около 60 мг.

47. Способ по любому из пп. 1–33 или 38, в котором аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе около 70 мг.

48. Способ по любому из пп. 1–33 или 38, в котором аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе около 80 мг.

49. Способ по любому из пп. 38–48, в котором аналог гепсидина представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKF(K(PEG3-Palm))PRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:40) или ее фармацевтически приемлемую соль.

50. Способ по любому из пп. 38–48, в котором аналог гепсидина представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCI(K(isoGlu-Palm))FEPRSKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:45) или ее фармацевтически приемлемую соль.

51. Способ по любому из пп. 38–48, в котором аналог гепсидина представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKF(K(isoGlu-Palm))PRSKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:46) или ее фармацевтически приемлемую соль.

52. Способ по любому из пп. 38–48, в котором аналог гепсидина представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKFEP(K(isoGlu-Palm))SKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:47) или ее фармацевтически приемлемую соль.

53. Способ по любому из пп. 38–48, в котором аналог гепсидина представляет собой: изовалериановую кислоту-DTHFPCIKFEP(RS(K(isoGlu-Palm))) GCK-NH₂ (SEQ ID NO:48) или ее фармацевтически приемлемую соль.

54. Способ по любому из пп. 1–53, в котором истинная полицитемия представляет собой истинную полицитемию, требующую проведения кровопусканий.

55. Способ по любому из пп. 1–54, в котором истинная полицитемия представляет собой истинную полицитемию, требующую проведения кровопусканий у пациента с низким риском.

56. Способ по любому из пп. 1–54, в котором субъект является пациентом с низким риском истинной полицитемии или пациентом с высоким риском истинной полицитемии.

57. Способ по любому из пп. 1–56, в котором субъект является пациентом с симптомами истинной полицитемии, требующей проведения кровопусканий.

58. Способ по любому из пп. 1–54, в котором субъект является пациентом с низким риском истинной полицитемии, требующей проведения кровопусканий, или пациентом с высоким риском истинной полицитемии, требующей проведения кровопусканий.

59. Способ по любому из пп. 1–58, в котором субъекту поставлен диагноз истинной полицитемии и проведено по меньшей мере три кровопускания для достижения

гематокрита $\leq 45\%$ в течение 24 недель до введения субъекту фармацевтической композиции.

60. Способ по любому из пп. 1–33, 38 и 49–59, в котором субъекту вводят от около 5 мг до около 200 мг аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли.

61. Способ по любому из пп. 1–33, 38 и 49–59, в котором субъекту вводят от около 10 мг до около 100 мг аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли.

62. Способ по любому из пп. 1–33, 38 и 49–59, в котором субъекту вводят от около 20 мг до около 100 мг аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли.

63. Способ по любому из пп. 1–33, 38 и 49–59, в котором субъекту вводят около 20 мг аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли.

64. Способ по любому из пп. 1–33, 38 и 49–59, в котором субъекту вводят около 40 мг гепсидина или аналога гепсидина, или его фармацевтически приемлемой соли.

65. Способ по любому из пп. 1–33, 38 и 49–59, в котором субъекту вводят около 80 мг аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли.

66. Способ по любому из пп. 1–33, 38 и 49–59, в котором субъекту вводят около 100 мг аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли.

67. Способ по любому из пп. 1–33, 38 и 49–59, в котором субъекту вводят около 120 мг аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли.

68. Способ по любому из пп. 1–67, в котором аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль, или фармацевтическую композицию вводят путем подкожной инъекции.

69. Способ по любому из пп. 1–68, в котором аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль, или фармацевтическую композицию вводят примерно еженедельно в течение определенного периода времени.

70. Способ по любому из пп. 1–69, в котором количество вводимого аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли увеличивается в течение определенного периода времени.

71. Способ по любому из пп. 1–69, дополнительно включающий в себя определение уровня гематокрита у субъекта в одной или более временных точках после введения аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли, и поддержание или корректировку количества вводимого субъекту аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли, причем количество увеличивают, если установленный гематокрит субъекта больше 45, при этом количество уменьшают, если установленный гематокрит субъекта меньше 37,5 или 40, и поддерживают количество, если установленный гематокрит субъекта составляет от 37,5 до 45 или от 40 до 44.

72. Способ по любому из пп. 1–71, в котором субъект является млекопитающим.

73. Способ по любому из пп. 1–72, в котором субъект является человеком.

74. Способ по п. 72 или п. 73, в котором субъект получает циторедуктивную терапию, в качестве варианта, гидроксимочевину.

75. Способ по любому из пп. 1–74, причем применение способа приводит к снижению уровня гематокрита у субъекта до $\leq 45\%$.

76. Способ по любому из пп. 1–75, причем применение способа приводит к снижению гематокрита по меньшей мере на 3%.

77. Способ по любому из пп. 1–76, причем применение способа приводит к увеличению сывороточного ферритина у субъекта.

78. Способ по любому из пп. 1–77, причем применение способа не вызывает существенного изменения количества тромбоцитов у субъекта.

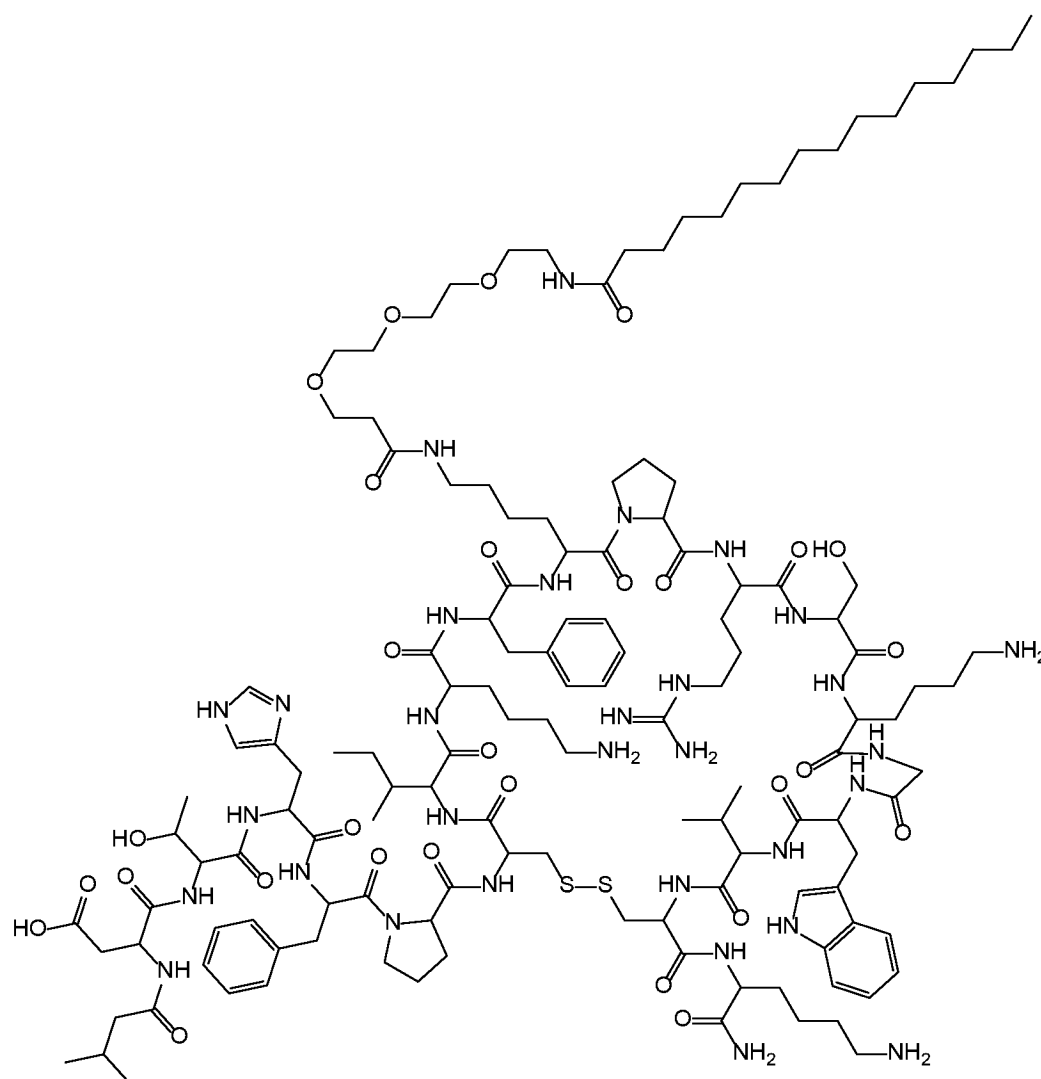
79. Способ по любому из пп. 1–78, причем применение способа не вызывает существенного увеличения лейкоцитов или белых кровяных телец в крови или сыворотке субъекта.

80. Способ по любому из пунктов 1–79, в котором субъекту не проводят кровопускания на протяжении курса лечения, например лечения примерно один раз в неделю, примерно один раз в две недели или примерно один раз в месяц в течение определенного периода времени.

81. Способ по любому из пп. 1–80, причем способ включает в себя многократное введение эффективного количества аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли в течение определенного периода времени, причем, в качестве варианта, аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту примерно один раз в неделю в течение определенного периода времени.

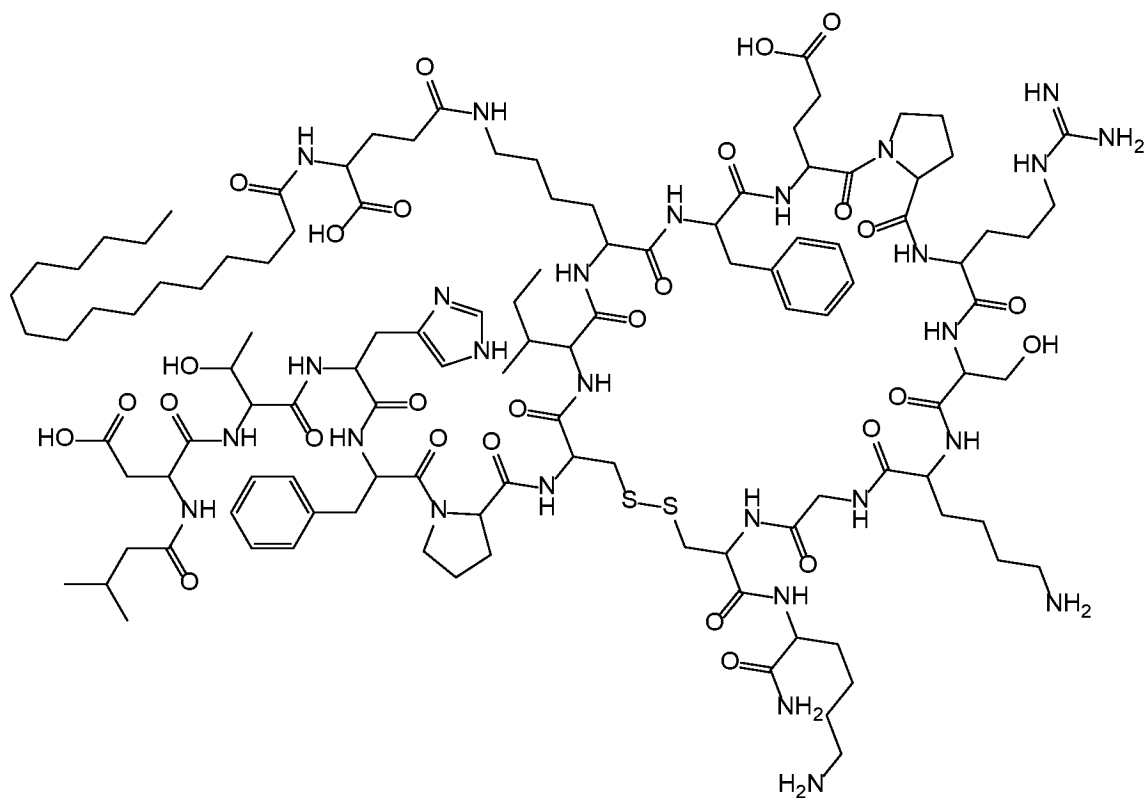
82. Способ по п. 81, в котором аналог гепсидина выбран из группы, состоящей из:

(a)



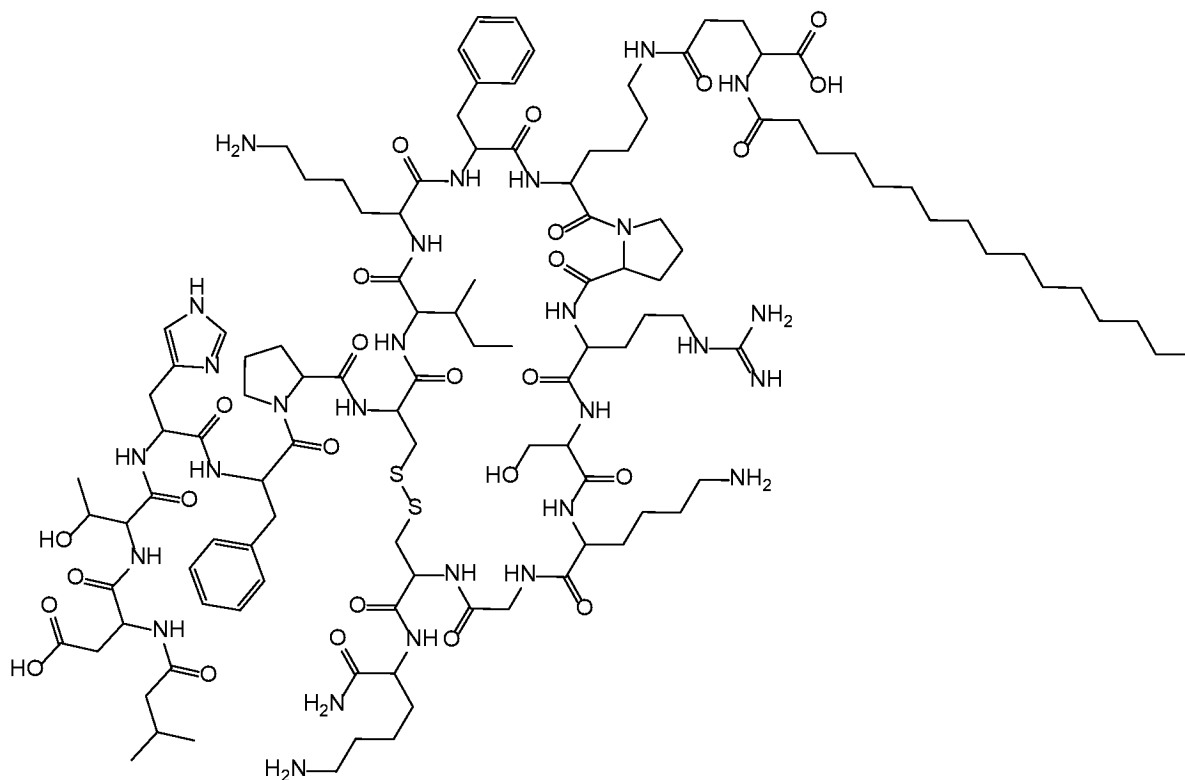
изовалериановой кислоты-DTHFPCIKF(K(PEG3-Palm))PRSKGWVCK-NH₂ (SEQ ID NO:40) или ее фармацевтически приемлемой соли;

(b)



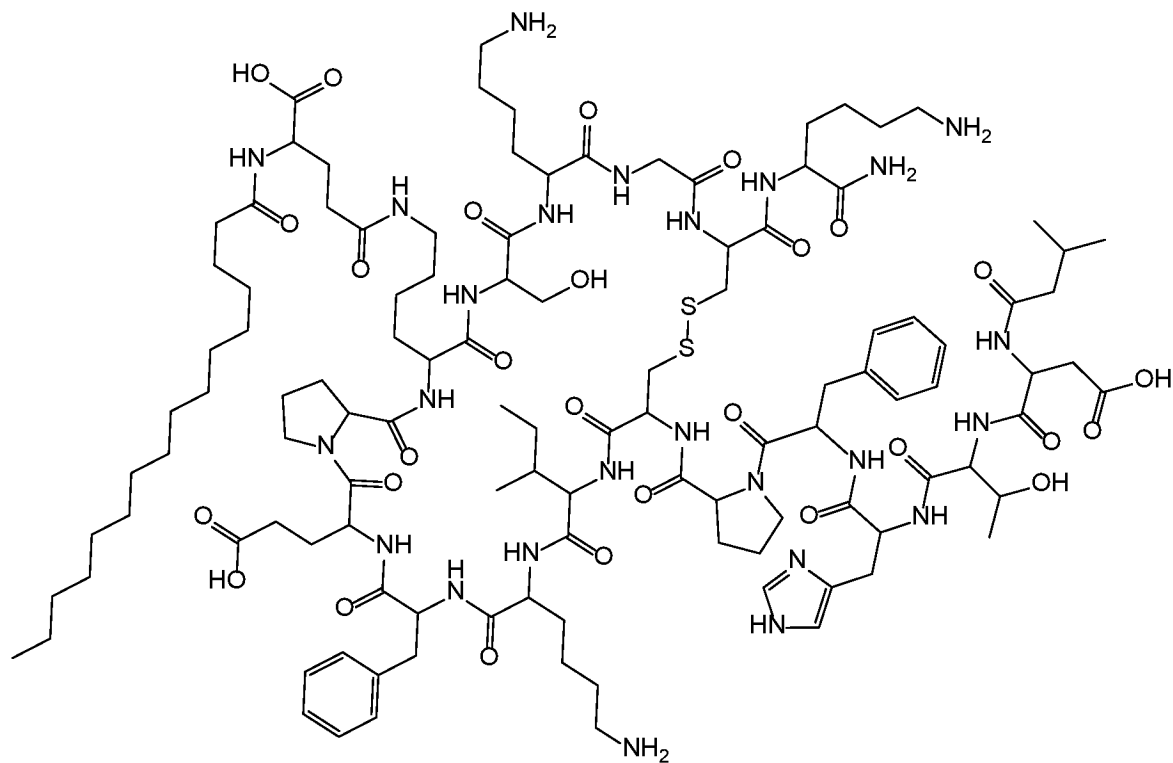
изовалериановой кислоты-DTHFPCI(K(isoGlu-Palm))FEPRSKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:45)
или ее фармацевтически приемлемой соли;

(c)



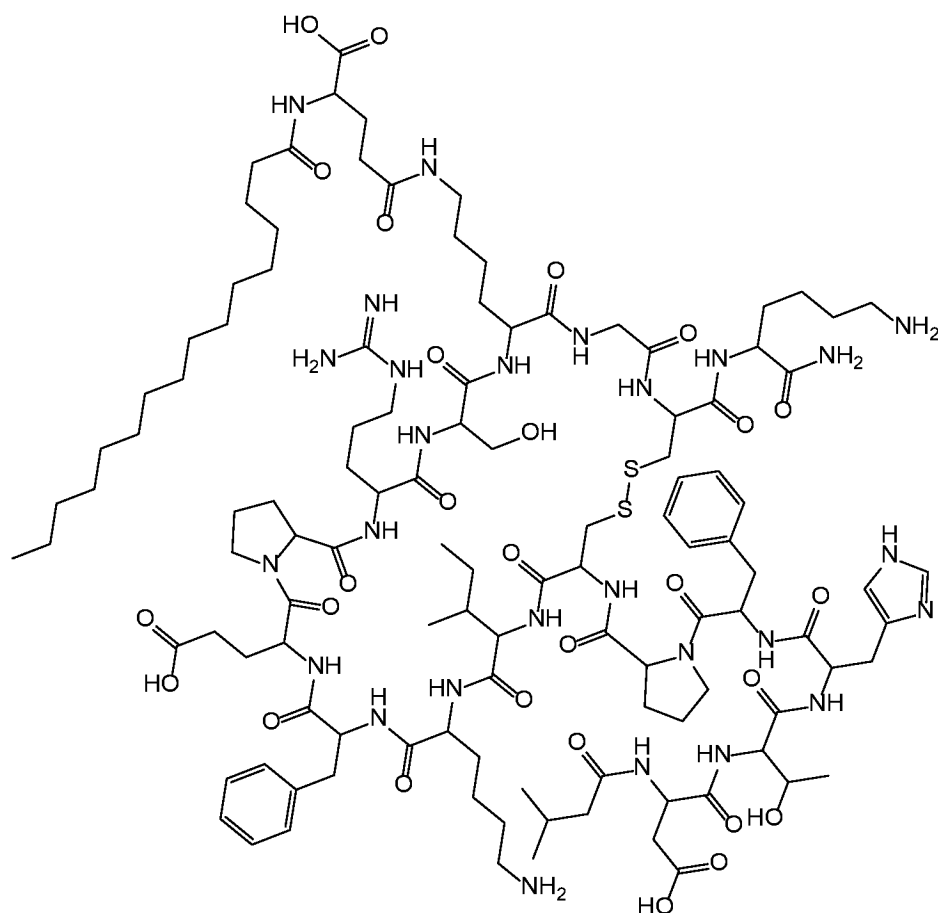
изовалериановой кислоты-DTHFPCIKF(K(isoGlu-Palm))PRSKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:46)
или ее фармацевтически приемлемой соли;

(d)



изовалериановой кислоты-DTHFPCIKFEP(K(isoGlu-Palm))SKGCK-NH₂ (SEQ ID NO:47)
или ее фармацевтически приемлемой соли и

(e)



изовалериановой кислоты-DTHFPCIKFEPRS(K(isoGlu-Palm))GCK-NH₂(SEQ ID NO:48)
или ее фармацевтически приемлемой соли,

причем аминокислоты представлены L-аминокислотами;

при этом, в качестве варианта, аналог гепсидина содержит дисульфидную связь между двумя аминокислотами Cys;

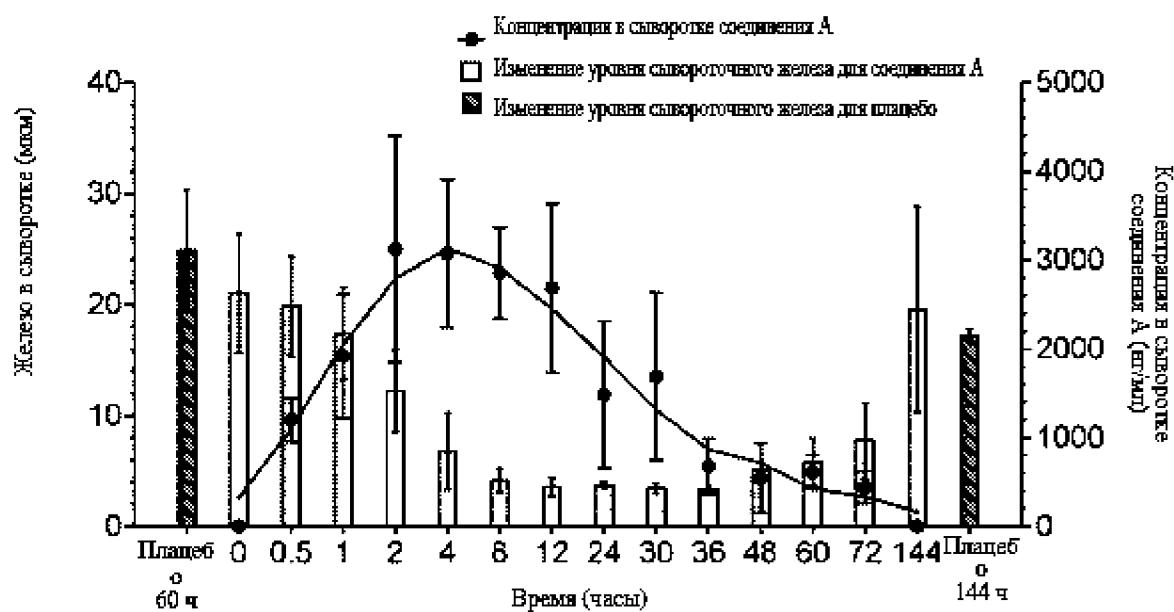
причем аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе около 10 мг, около 15 мг, около 20 мг, около 25 мг, около 30 мг, около 35 мг, около 40 мг, около 50 мг, около 60 мг, около 70 мг или около 80 мг примерно один раз в неделю в течение определенного периода времени;

при этом аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту подкожным способом введения;

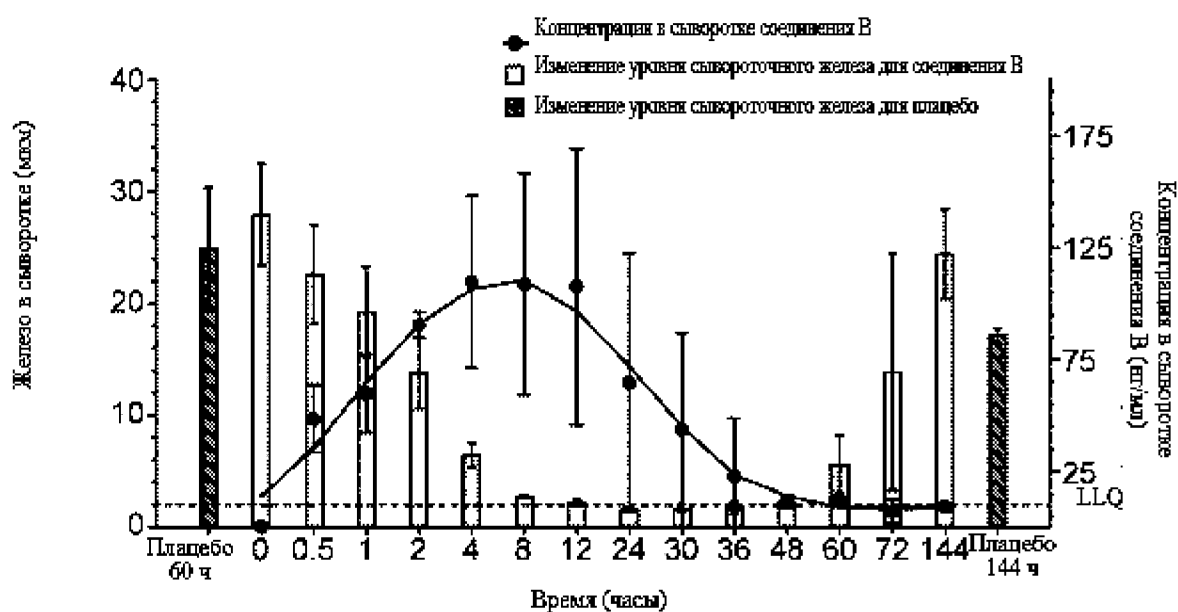
причем субъект является человеком;

при этом, в качестве варианта, аналог гепсидина или его фармацевтически приемлемая соль присутствует в фармацевтической композиции, дополнительно содержащей фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или разбавитель;

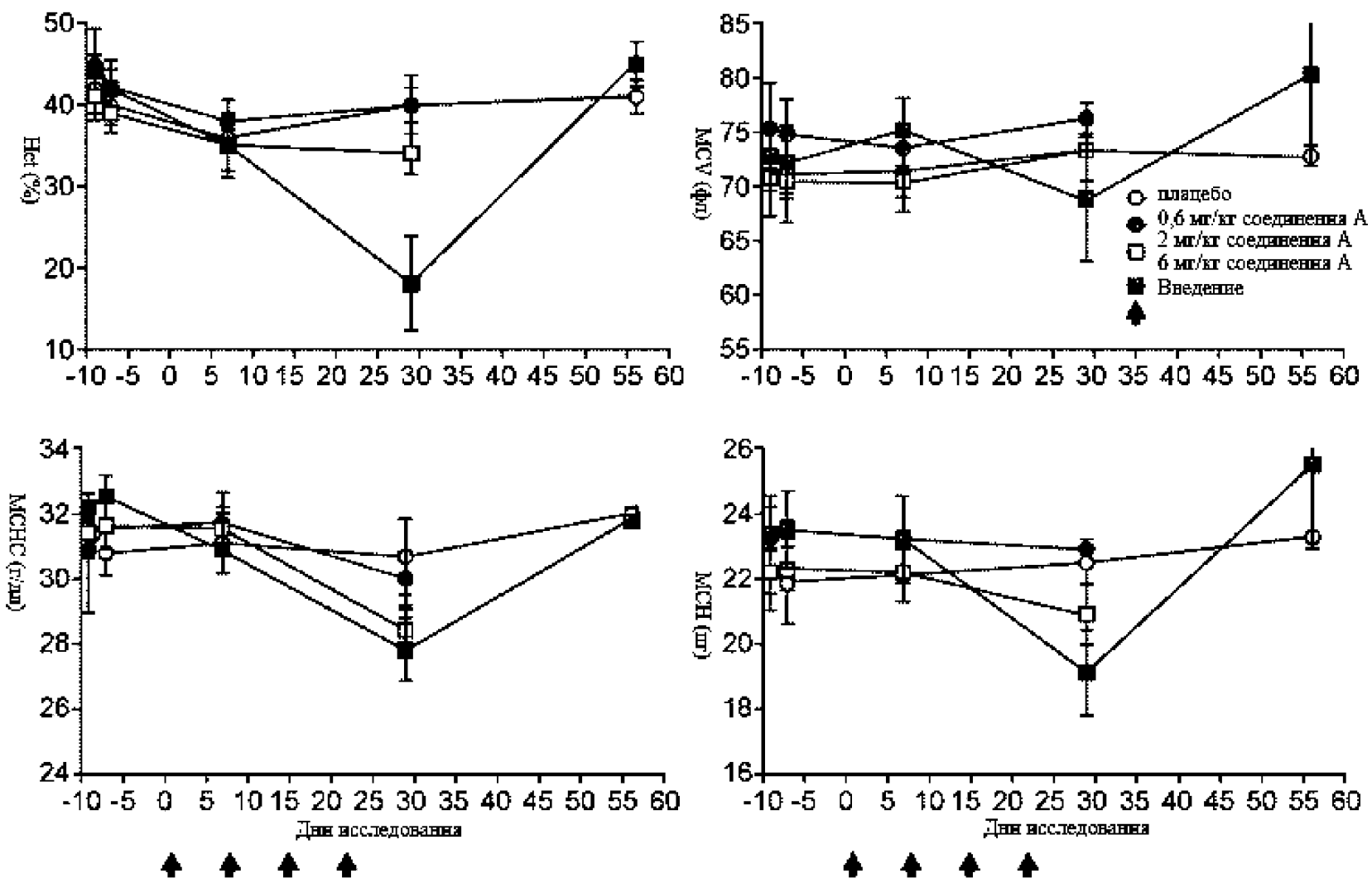
причем способ дополнительно включает в себя определение гематокрита субъекта после одного или более из многократных введений аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли, и поддержание или корректировку количества аналога гепсидина или его фармацевтически приемлемой соли, вводимой субъекту в следующий раз, причем следующее вводимое количество увеличивают, если установленный гематокрит субъекта выше допустимого диапазона с учетом пола и состояния беременности субъекта, при этом следующее вводимое количество уменьшают, если установленный гематокрит субъекта ниже допустимого диапазона, и при этом следующее вводимое количество такое же, как и ранее введенное количество, если установленный гематокрит субъекта находится в пределах допустимого диапазона.



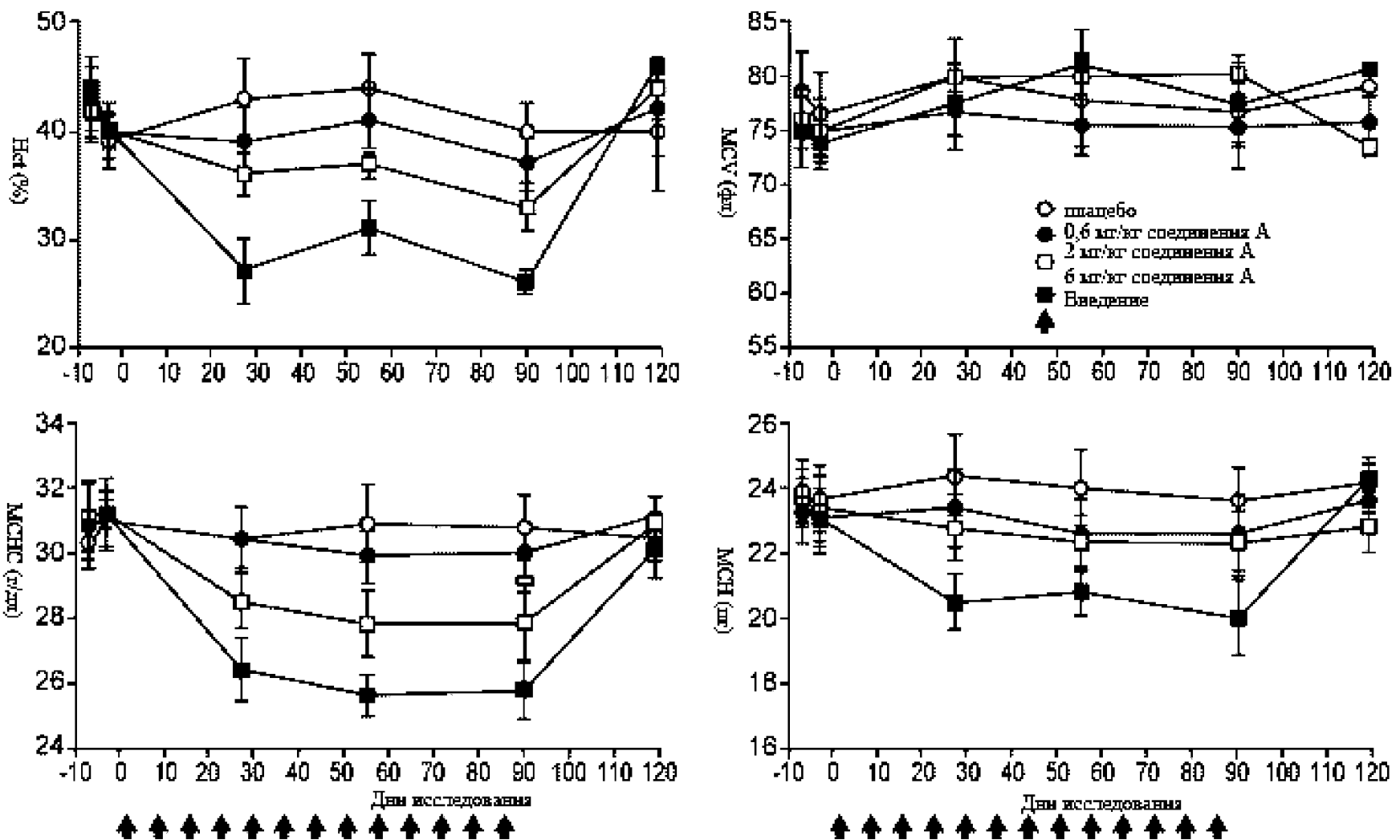
Фиг. 1А



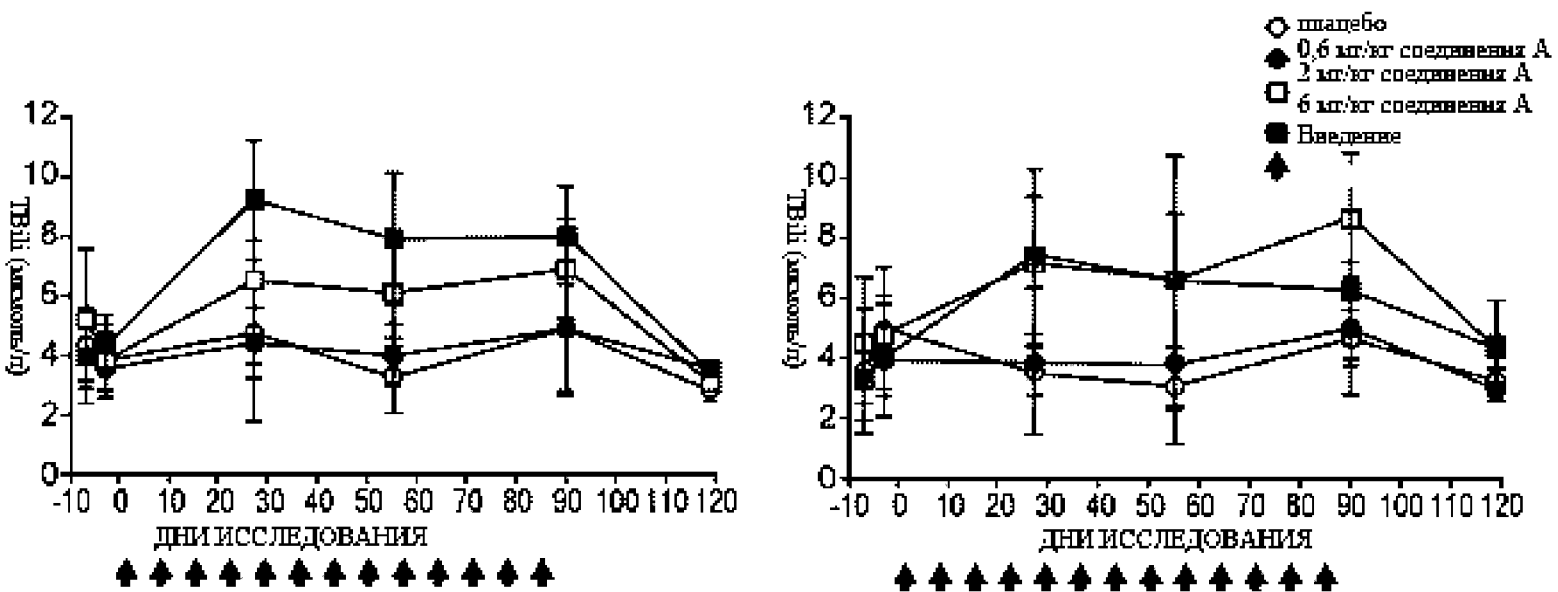
Фиг. 1В



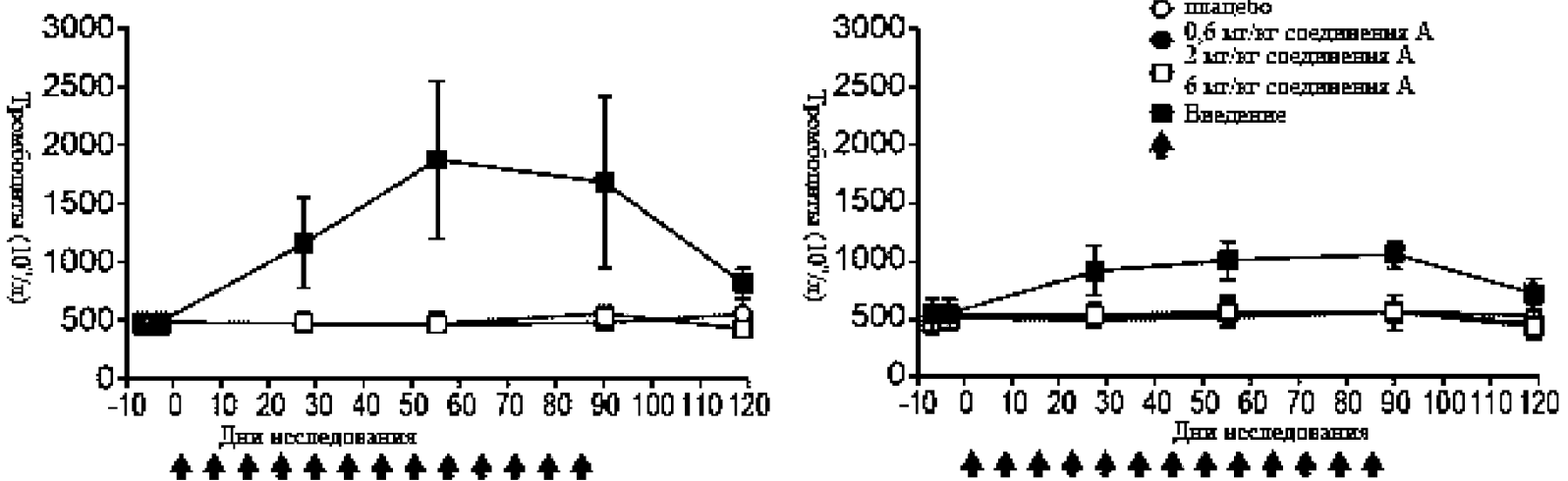
Фиг. 2



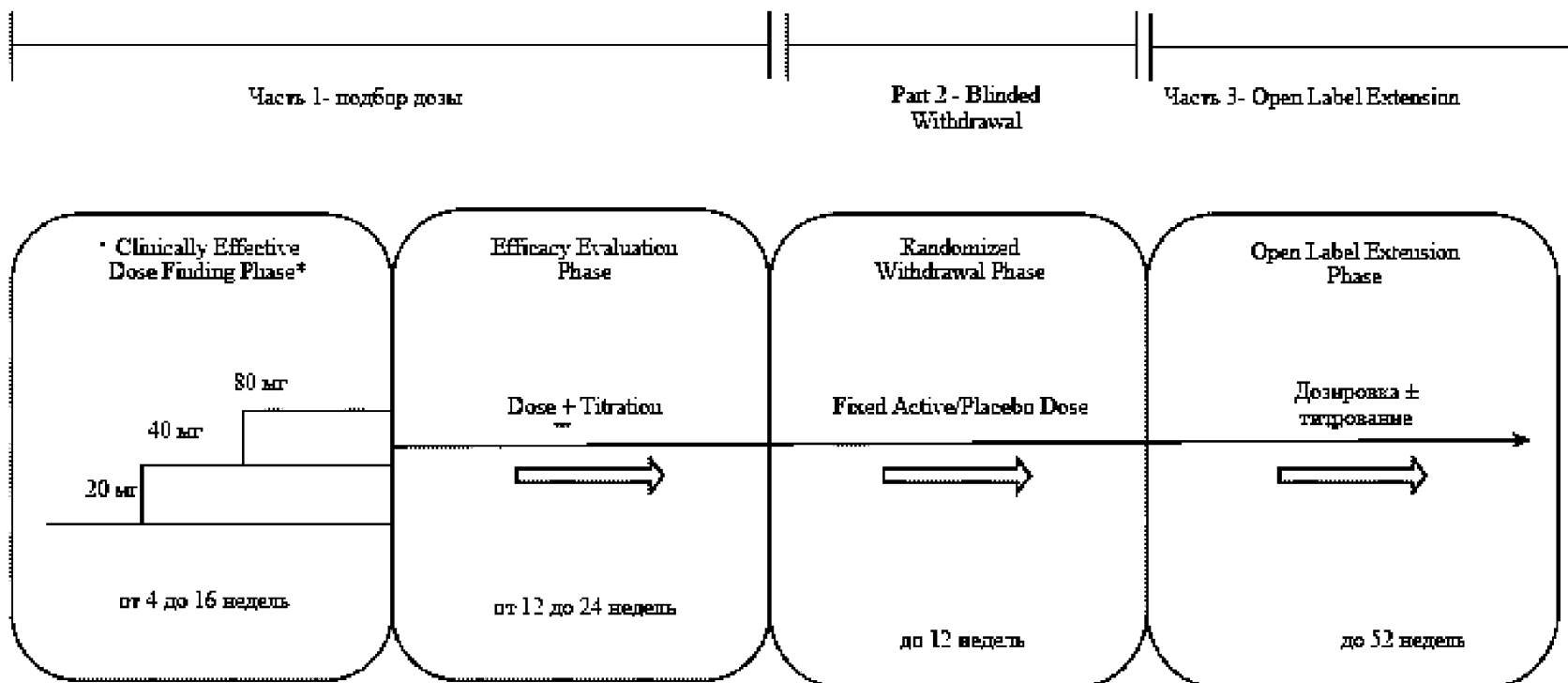
Фиг. 3



Фиг. 4

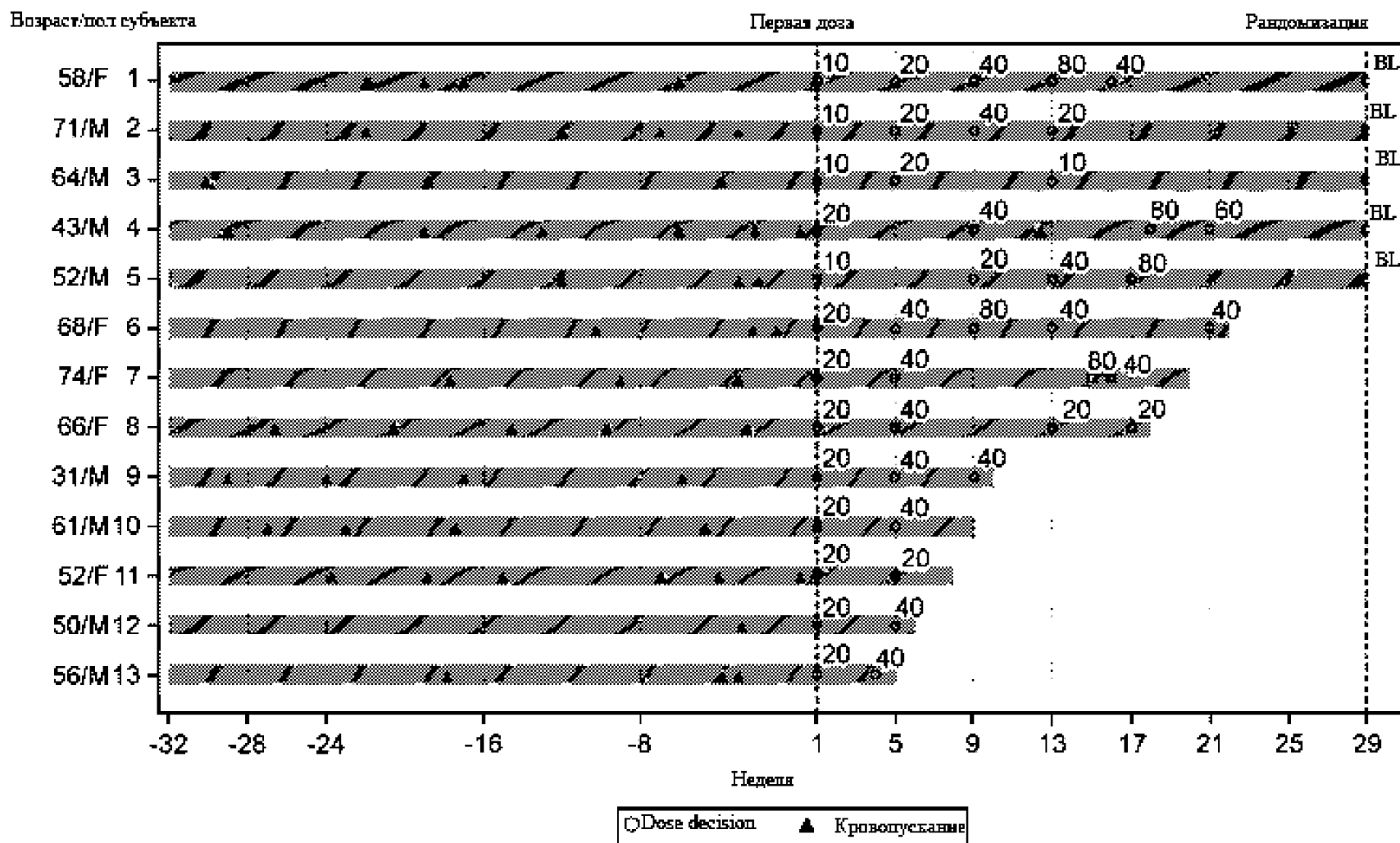


Фиг. 5

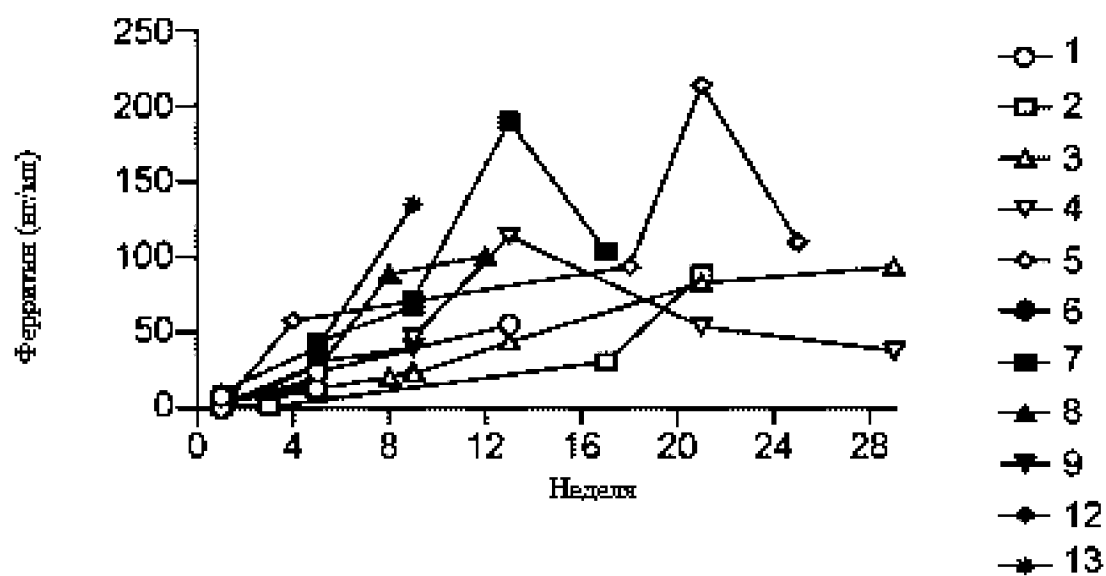


- * Titrate every 4 weeks to maintain hematocrit < 45%

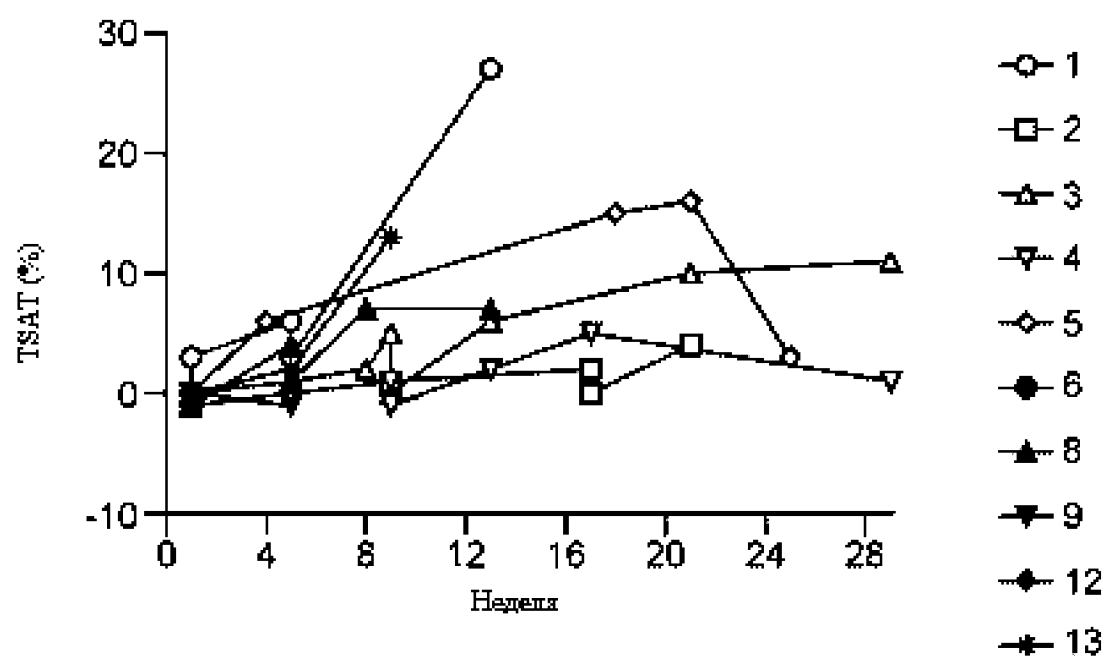
Фиг. 6



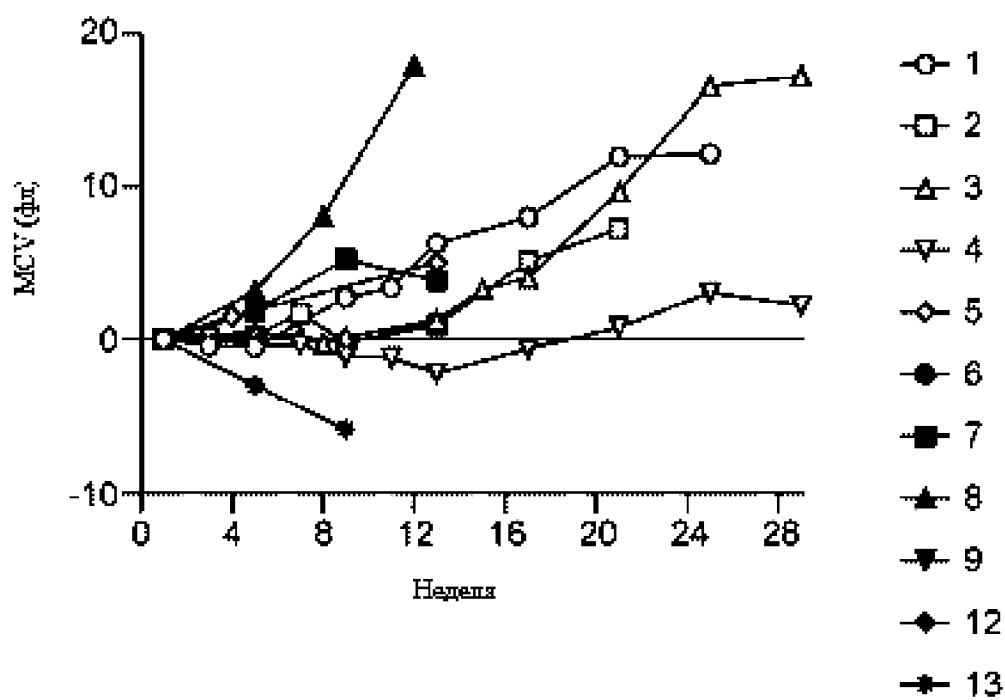
Фиг. 7



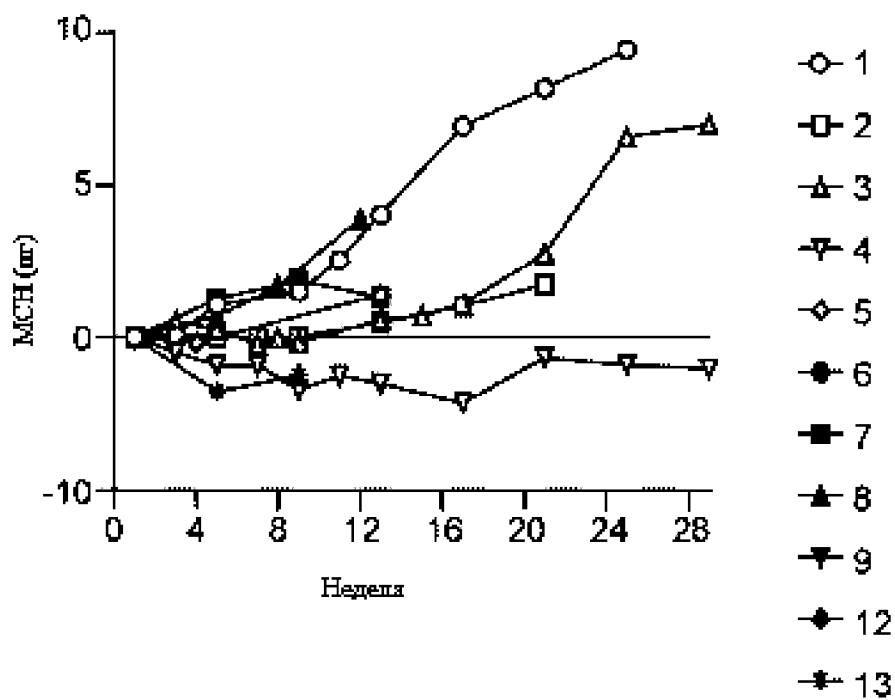
Фиг. 8



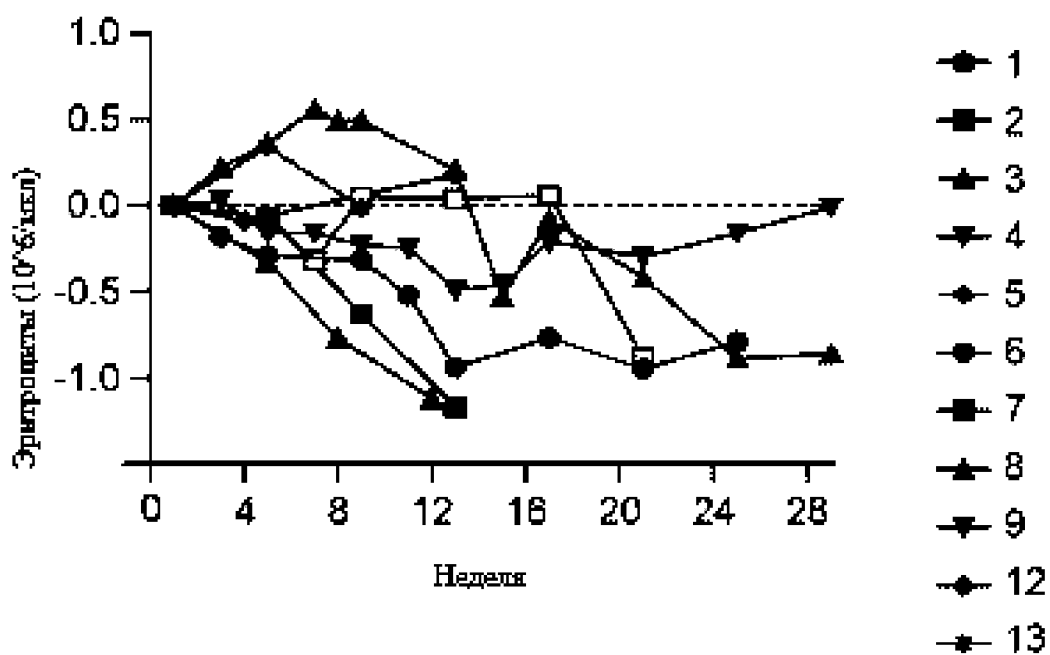
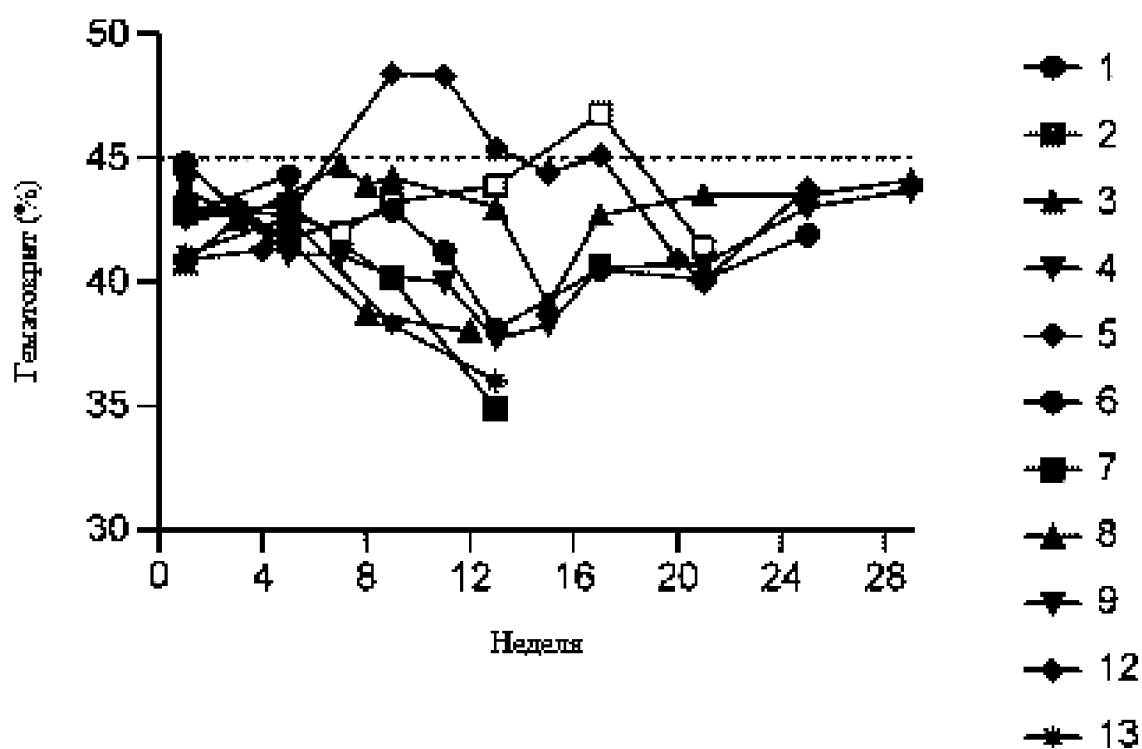
Фиг. 9

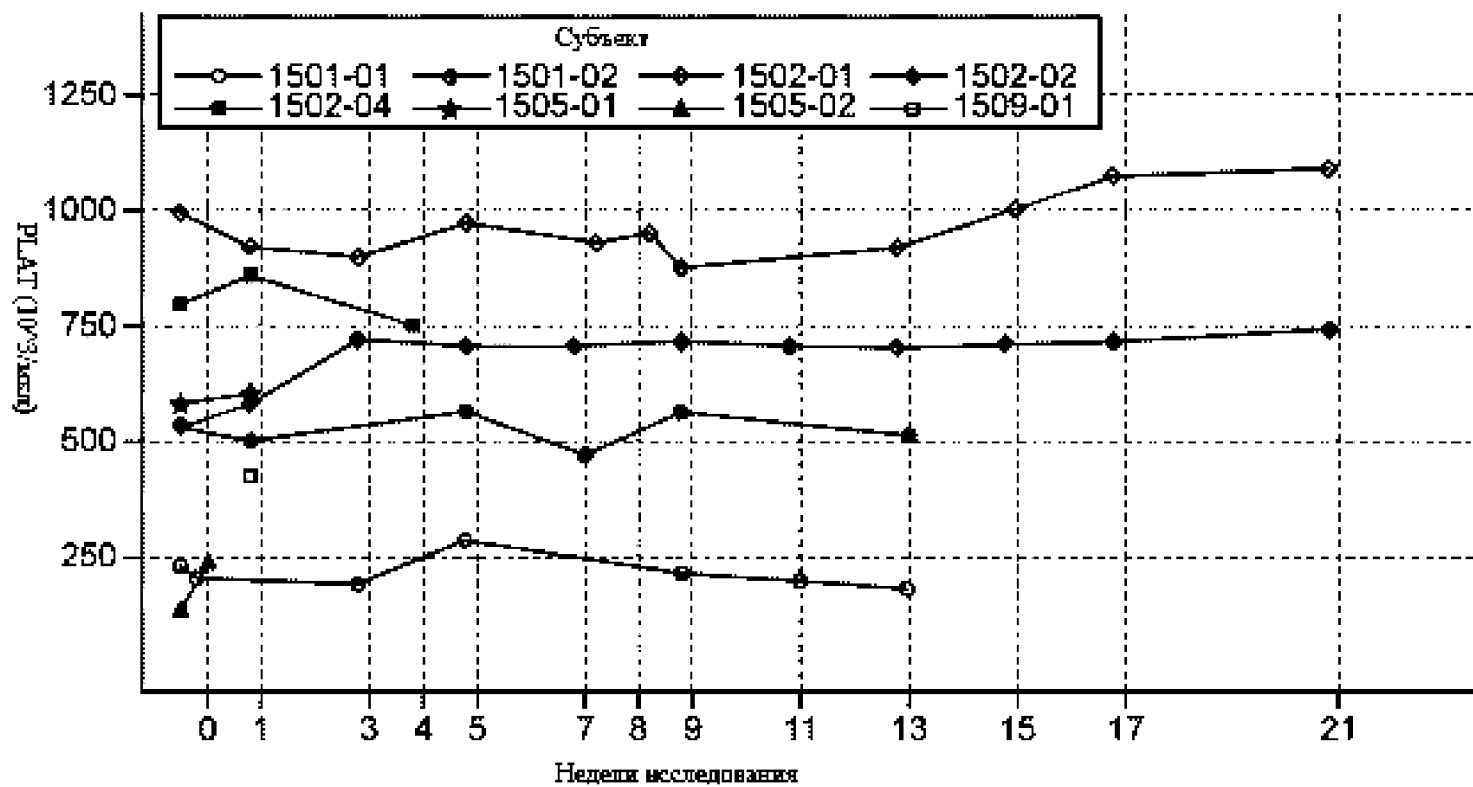


Фиг. 10



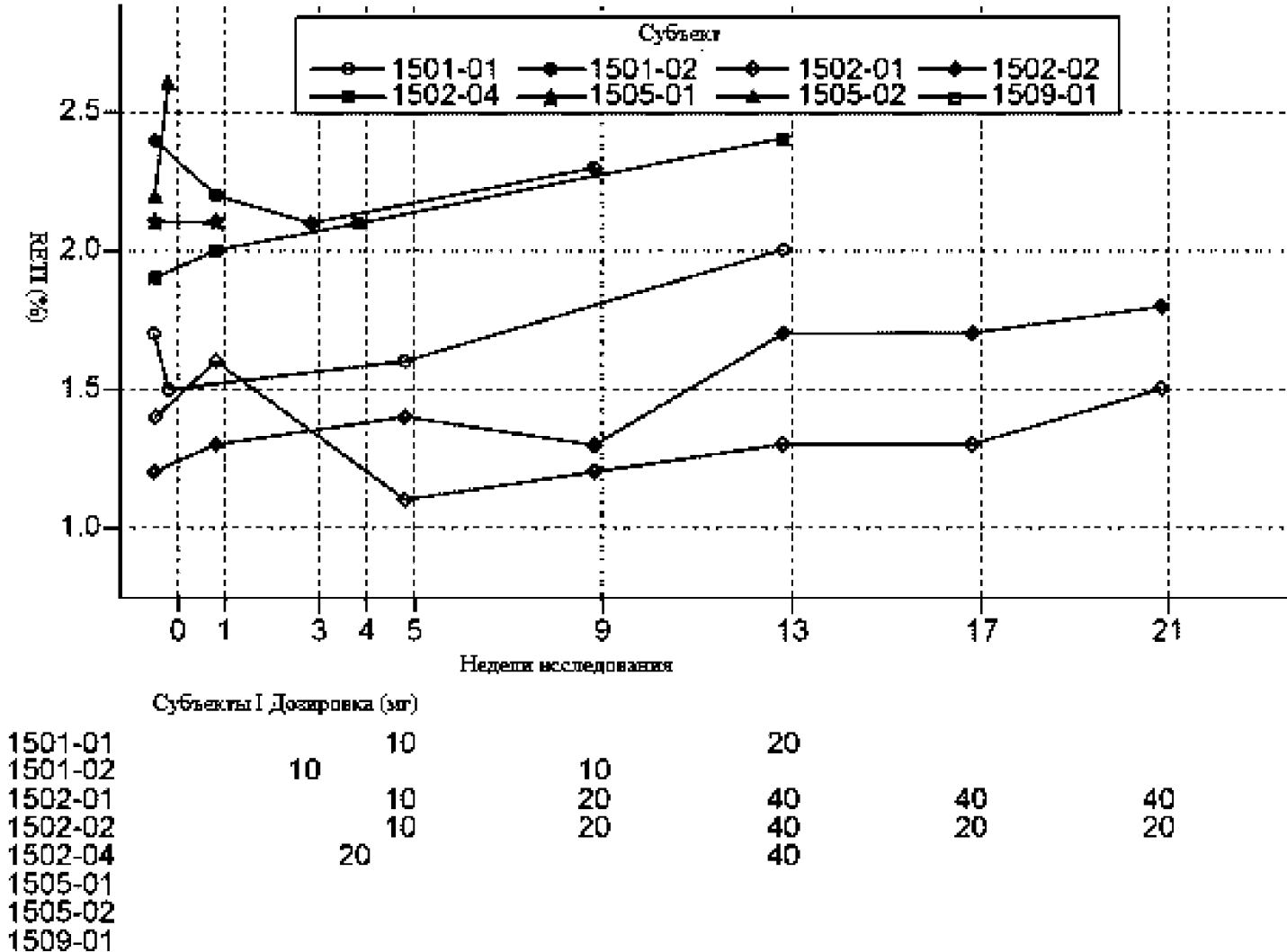
Фиг. 11



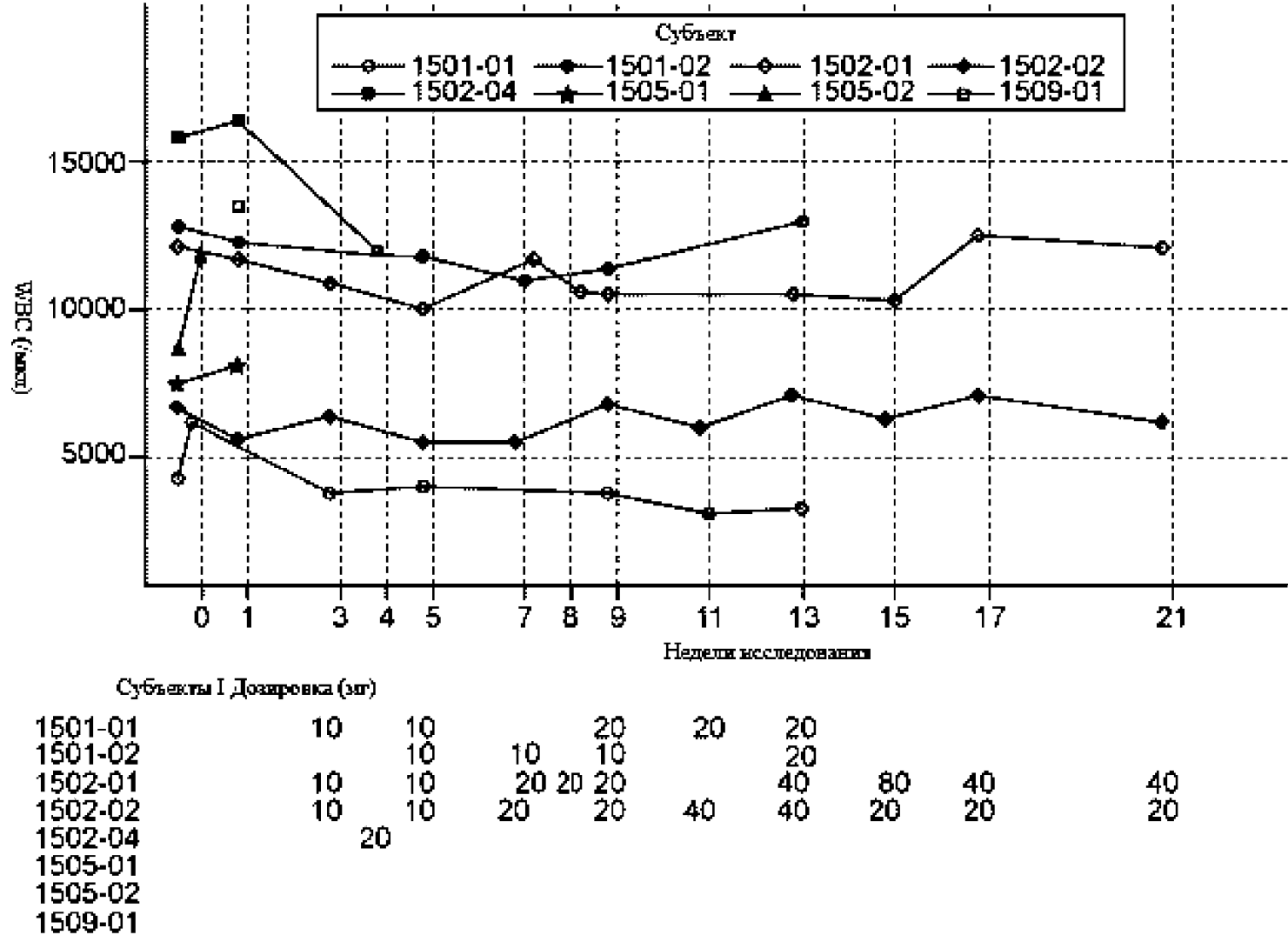


Субъекты I		Дозировка (мг)											
1501-01		10	10			20	20	20					
1501-02			10	10		10	10		20	20			
1502-01		10	10		20	20	20		40	80	40		40
1502-02		10	10		20	20	20	40	20	20	20		20
1502-04			20										
1505-01													
1505-02													
1509-01													

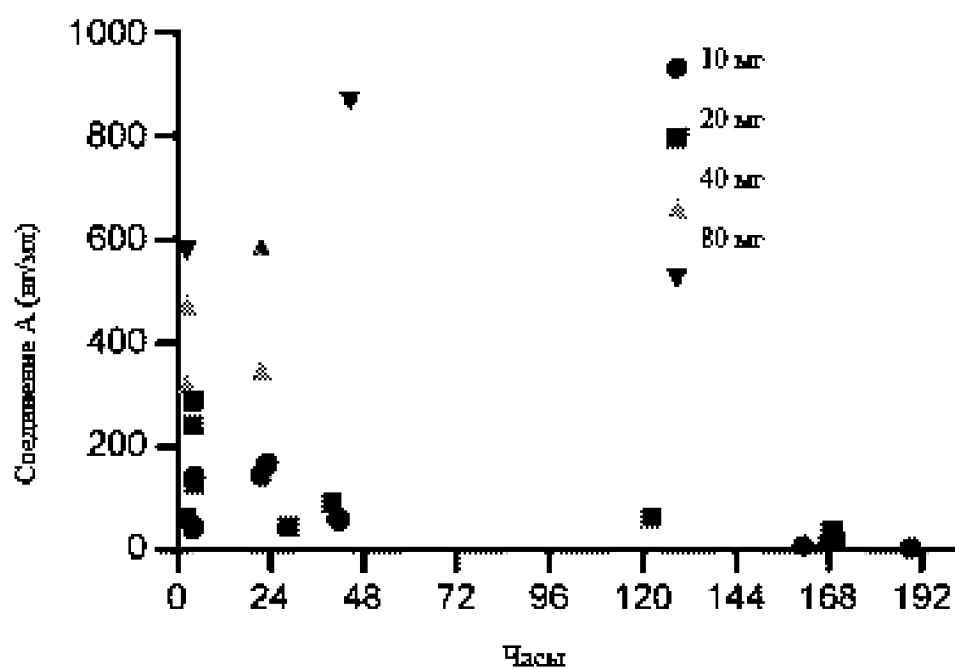
Фиг. 14



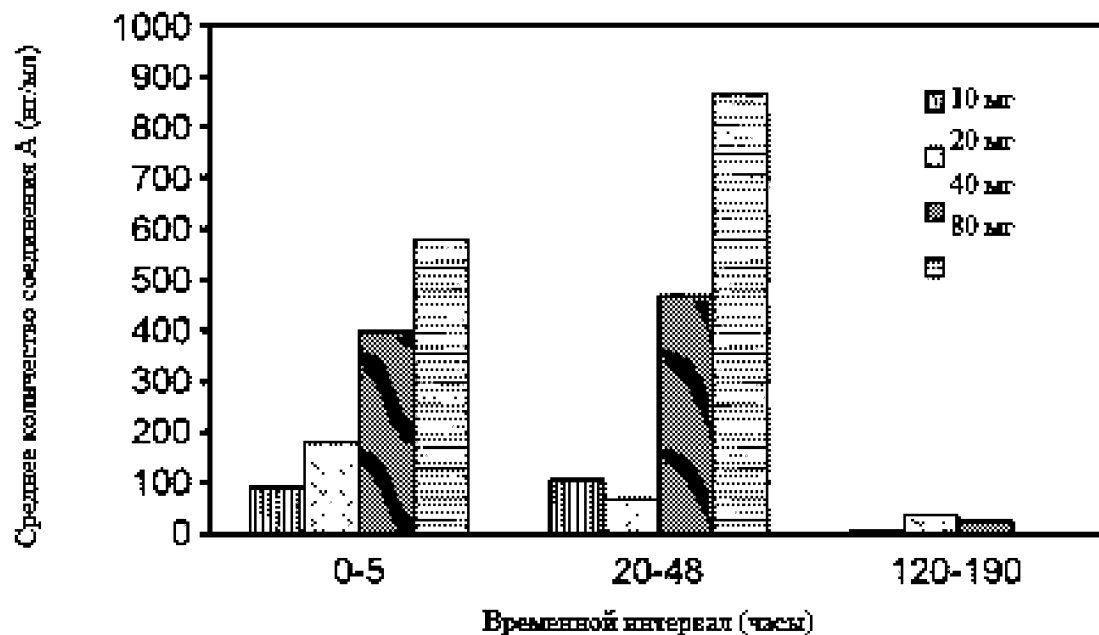
Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17А



Фиг. 17Б