



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/713 (2023.08); C12N 15/00 (2023.08); A61P 9/00 (2023.08)

(21)(22) Заявка: 2022100450, 12.06.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
12.06.2020Дата регистрации:  
11.01.2024

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
14.06.2019 EP 19180308.9;  
08.01.2020 EP 20150700.1;  
10.03.2020 EP 20162110.9;  
18.05.2020 EP 20175240.9

(43) Дата публикации заявки: 14.07.2023 Бюл. № 20

(45) Опубликовано: 11.01.2024 Бюл. № 2

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 14.01.2022(86) Заявка РСТ:  
EP 2020/066273 (12.06.2020)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2020/249713 (17.12.2020)Адрес для переписки:  
101000, Москва, ул. Мясницкая, 13, стр. 5, ООО  
"Союзпатент", С.Б. Фелициной

(72) Автор(ы):

ТУМ, Томас (DE),  
УЛЬБРИХ, Клаудиа (DE),  
ХАУКЕ, Вилфрид (DE),  
РУМП, Штеффен (DE),  
БАТКАЙ, Сандор (DE)

(73) Патентообладатель(и):

КАРДИОРФАРМАСЬЮТИКАЛЗ ГМБХ  
(DE)(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: R. HINKEL et al. P5384 LNA-based  
miR132 inhibition is cardioprotective in a pig  
model of percutaneous transverse aortic  
constriction (pTAC). European heart journal,  
2017, vol. 38, No. 1, p.5384. WO 2013034653 A1,  
14.03.2013. AHMET UCAR et al. The miRNA-  
212/132 family regulates both cardiac hypertrophy  
and cardiomyocyte autophagy. Nature (см.  
прод.)

## (54) ЛЕЧЕНИЕ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У ЧЕЛОВЕКА

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области  
медицины, а именно к фармацевтической  
промышленности. Применение олигонуклеотида,  
содержащего последовательность формулы III:

5'-dA\*+T\*dG\*+G\*dC\*+T\*dG\*+T\*dA\*+  
G\*dA\*dC\*dT\*dG\*+T\*+T 3', где dA представляет  
собой 2'-дезоксиаденозин, dG представляет собой  
2'-дезоксигуанозин, dC представляет собой 2'-  
дезоксцитидин и T представляет собой тимидин,  
причем +T представляет собой строительный блок

LNA-T, и +G представляет собой строительный  
блок LNA-G, и где \* представляет собой  
фосфоротиоатную связь, в профилактике или  
лечении сердечного нарушения у человека, при  
этом сердечное нарушение выбрано из (i) острой  
или подострой сердечной недостаточности, (ii)  
хронической и/или ухудшающейся хронической  
сердечной недостаточности, (iii) стабильной  
сердечной недостаточности, (iv) менее  
прогрессирующего состояния сердечной

недостаточности или прогрессирующим состоянием сердечной недостаточности, (v) сердечной недостаточности I и/или II стадии по NYHA, I, II и/или III стадии по NYHA или III и/или IV стадии по NYHA, и (vi) левосторонней или правосторонней сердечной недостаточности; применение олигонуклеотида, содержащего последовательность формулы III:

5'-dA\*+T\*dG\*+G\*dC\*+T\*dG\*+T\*dA\*+G\*dA\*dC\*dT\*dG\*+T\*+T-3', где dA представляет собой 2'-дезоксаденозин, dG представляет собой 2'-дезоксигуанозин, dC представляет собой 2'-дезоксцитидин и T представляет собой тимидин, где +T представляет собой строительный блок LNA-T, и +G представляет собой строительный блок LNA-G, и где \* представляет собой тиофосфатную связь, в профилактике или лечении фиброзного нарушения; способ мониторинга терапии олигонуклеотидом, являющимся

объектом применения указанного олигонуклеотида, включающий определение количества и/или активности miR-132 в образце, полученном от субъекта, которому вводили олигонуклеотид, при этом определение проводят один или несколько раз в течение курса терапии; применение набора, содержащего: праймер, связывающийся с ДНК, кодирующей miR-132, или с ДНК, которая комплементарна указанной, праймер, связывающийся с ДНК, кодирующей miR-39, или с ДНК, которая комплементарна указанной, необязательно положительный контроль hsa-miR-132, и необязательно положительный контроль miR-39, в указанном способе мониторинга терапии. Использование группы изобретений обеспечивает профилактику и лечение сердечных и/или фиброзных нарушений. 4 н. и 27 з.п. ф-лы, 36 ил., 16 пр.

(56) (продолжение):

communications, 2012, vol. 3, no. 1, pp. 1-11. EA 30211 B1, 31.07.2018. WO 2016042561 A3, 24.03.2016. SEEMA DANGWAL et al. microRNA Therapeutics in Cardiovascular Disease Models, ANNUAL REVIEW OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY, 06.01.2014, vol. 54, No. 1, page 185-200. THOMAS THUM. Facts and updates about cardiovascular non-coding RNAs in heart failure : Facts and updates RNAs. ESC HEART FAILURE, 03.08.2015, vol. 2, No. 3, page 108-111.

R U 2 8 1 1 3 6 5 C 2

R U 2 8 1 1 3 6 5 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A61K 31/713* (2006.01)  
*C12N 15/00* (2006.01)  
*A61P 9/00* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*A61K 31/713 (2023.08); C12N 15/00 (2023.08); A61P 9/00 (2023.08)*

(21)(22) Application: **2022100450, 12.06.2020**

(24) Effective date for property rights:  
**12.06.2020**

Registration date:  
**11.01.2024**

Priority:

(30) Convention priority:  
**14.06.2019 EP 19180308.9;**  
**08.01.2020 EP 20150700.1;**  
**10.03.2020 EP 20162110.9;**  
**18.05.2020 EP 20175240.9**

(43) Application published: **14.07.2023 Bull. № 20**

(45) Date of publication: **11.01.2024 Bull. № 2**

(85) Commencement of national phase: **14.01.2022**

(86) PCT application:  
**EP 2020/066273 (12.06.2020)**

(87) PCT publication:  
**WO 2020/249713 (17.12.2020)**

Mail address:  
**101000, Moskva, ul. Myasnitskaya, 13, str. 5, OOO**  
**"Soyuzpatent", S.B. Felitsinoj**

(72) Inventor(s):

**THUM, Thomas (DE),**  
**ULBRICH, Claudia (DE),**  
**HAUKE, Wilfried (DE),**  
**RUMP, Steffen (DE),**  
**BATKAI, Sandor (DE)**

(73) Proprietor(s):

**CARDIOR PHARMACEUTICALS GMBH**  
**(DE)**

(54) **TREATMENT OF HEART FAILURE IN HUMANS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmaceutical industry.

SUBSTANCE: use of an oligonucleotide containing a sequence of formula III:

5'-dA\*+T\*dG\*+G\*dC\*+T\*dG\*+T\*dA\*+G\*dA\*dC\*dT\*dG\*+T\*+T 3', where dA represents 2'-deoxyadenosine, dG is 2'-deoxyguanosine, dC is 2'-deoxycytidine, and T is thymidine, where +T is a LNA-T building block, and +G is a LNA-G building block, and where \* represents is a phosphorothioate linkage, in the prevention or treatment of a cardiac disorder in a human, wherein the cardiac disorder is

selected from (i) acute or subacute heart failure, (ii) chronic and/or worsening chronic heart failure, (iii) stable heart failure, (iv) less advanced heart failure or advanced heart failure, (v) NYHA stage I and/or II heart failure, NYHA stage I, II and/or III or NYHA stage III and/or IV, and (vi) left-sided or right-sided heart failure; use of an oligonucleotide containing a sequence of formula III:

5'-dA\*+T\*dG\*+G\*dC\*+T\*dG\*+T\*dA\*+G\*dA\*dC\*dT\*dG\*+T\*+T-3', where dA represents 2'-deoxyadenosine, dG is 2'-deoxyguanosine, dC is 2'-

**RU 2 811 365 C 2**

**RU 2 811 365 C 2**

deoxycytidine, and T is thymidine, where +T is the LNA-T building block, and +G is the LNA-G building block, and where \* is a thiophosphate bond, in the prevention or treatment of fibrotic disorder; a method of monitoring therapy with an oligonucleotide that is the target of said nucleotide, comprising determining the amount and/or activity of miR-132 in a sample obtained from a subject to whom the oligonucleotide was administered, the determination being carried out one or more times during the course of therapy; use of a kit containing: a primer that binds to DNA encoding

miR-132 or DNA that is complementary to the specified, a primer that binds to DNA encoding miR-39 or DNA that is complementary to the specified, optional positive control hsa-miR-132, and optionally a positive control for miR-39, in the said method of monitoring therapy.

EFFECT: use of a group of inventions ensures the prevention and treatment of cardiac and/or fibrotic disorders.

31 cl, 36 dwg, 16 ex

R U 2 8 1 1 3 6 5 C 2

R U 2 8 1 1 3 6 5 C 2

Настоящее изобретение относится к олигонуклеотиду, который является эффективным ингибитором микроРНК miR-132, и его применению в медицине, в частности, для профилактики или лечения сердечных нарушений и/или фиброзных нарушений у человека.

5 Сердечная недостаточность является одной из ведущих патологических причин смертности в мире. Инфаркт миокарда (ИМ) является наиболее важной причиной сердечной недостаточности, поскольку приводит к последующему прогрессирующему неблагоприятному ремоделированию сердца и, в результате, к сердечной  
10 недостаточности с плохим прогнозом. Применяемые в настоящее время терапевтические фармакологические варианты лечения сердечной недостаточности включают ангиотензин-модулирующие агенты,  $\beta$ -блокаторы, диуретики, антагонисты альдостерона, блокаторы рецепторов ангиотензина II в сочетании с ингибиторами неприлизина, вазодилататорами, инотропными агентами или ингибиторами SGLT-2. Хотя несколько клинических исследований показали значительное снижение смертности,  
15 индуцированной сердечной недостаточностью, для всех этих агентов, пятилетняя смертность остается неприемлемо высокой и составляет почти 50%. Таким образом, существует большая потребность в разработке новых и более эффективных терапевтических подходов к лечению сердечной недостаточности.

Патологический гипертрофический рост кардиомиоцитов может привести к развитию  
20 ремоделирования сердца, сердечной недостаточности и внезапной сердечной смерти. Гипертрофический рост кардиомиоцитов является ответом на повышенное напряжение сердечной стенки, вызванное перегрузкой сердца объемом крови и/или давлением. Изначально гипертрофия сердца является компенсаторным механизмом, направленным на уменьшение нагрузки на стенку и увеличение сердечного выброса. Однако длительная  
25 гипертрофия сердца прогрессирует до сократительной дисфункции, сердечной декомпенсации и, в конечном итоге, сердечной недостаточности (Hill and Olson, 2008; Barry and Townsend, 2010). Переход от физиологической к патологической гипертрофии может происходить в зависимости от многих факторов, включая утрату миоцитов вследствие апоптоза или некроза, изменения в аутофагии, дефекты сократительной  
30 реакции, нарушение регуляции гомеостаза кальция, десенсибилизацию адренергических рецепторов или сердечный фиброз (Hill and Olson, 2008; Barry и Townsend, 2010). Гипертрофическая передача сигналов в значительной степени опосредуется сигнальным путем инсулина (DeBosch and Muslin, 2008; Barry and Townsend, 2010). И инсулин, и инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1) активируют прогипертрофические пути в  
35 кардиомиоцитах через рецептор IGF-1, который активирует фосфоинозитин-3-киназу (PI3K) (McMullen et al., 2004). Активность PI3K приводит к активации серин/треонинкиназы Akt через ее фосфорилирование, и активная Akt фосфорилирует антигипертрофические факторы транскрипции FoxO, что приводит к их дестабилизации и предотвращению ядерной локализации (Datta et al., 1999; Skurk et al., 2005; Ronnebaum  
40 and Patterson, 2010). В противоположность этому, ацетилирование факторов FoxO с помощью сиртуина-1 (Sirt-1) приводит к их стабилизации и ядерной транслокации (Frescas et al., 2005). Стабилизированные факторы транскрипции FoxO локализуются в ядре, чтобы регулировать экспрессию антигипертрофических генов. Антигипертрофические функции белков FoxO в значительной степени опосредуются  
45 посредством супрессии прогипертрофического сигнального пути кальциневрина через экспрессию антигипертрофических генов-мишеней факторов FoxO, таких как атрогин-1 (Ni et al., 2006; Ronnebaum and Patterson, 2010; Glas, 2010). Более того, факторы транскрипции FoxO также вызывают апоптоз и регулируют аутофагию в кардиомиоцитах

(Ronnebaum and Patterson, 2010).

Было показано, что микроРНК играют ключевую роль в неблагоприятном ремоделировании сердца. В WO 2013/034653 описано, что miR-132 и/или miR-212 могут индуцировать гипертрофию сердца и, таким образом, являются потенциальными терапевтическими мишенями для лечения сердечной недостаточности.

В WO 2016/042561 описан способ лечения связанного с липидами нарушения путем введения субъекту терапевтически эффективного количества полинуклеотидного агента, который является по существу комплементарным нуклеотидной последовательности miR-132 человека.

Авторы настоящего изобретения идентифицировали новый аналог олигонуклеотида, который является эффективным ингибитором экспрессии miR-132 в кардиомиоцитах. Аналог олигонуклеотида, далее обозначаемый CDR132L, представляет собой миксмер, состоящий из строительных блоков ДНК и LNA, имеющий фосфоротиоатные межнуклеозидные связи.

Доклинические фармакологические исследования с применением CDR132L проводили на мышах и свиньях. В трансгенной мышинной модели гипертрофии сердца CDR132L привел к обратному ремоделированию сердца, ассоциированному со сниженной экспрессией miR-132. На мышинной модели сердечной недостаточности после инфаркта миокарда было обнаружено, что лечение CDR132L уменьшает дисфункцию левого желудочка после инфаркта миокарда и не зависящие от нагрузки параметры систолической сократительной функции. Кроме того, введение CDR132L привело к улучшению сердечной функции и уменьшило экспрессию miR-132, передачу сигнала сердечного стресса и гипертрофию после инфаркта миокарда.

На модели сердечной недостаточности после инфаркта миокарда у свиней было обнаружено, что лечение CDR132L предотвращает дезадаптивное ремоделирование и улучшает функцию левого желудочка. Кроме того, CDR132L нормализует тканевую экспрессию маркеров патологической сердечной недостаточности, таких как BNP, ANP, и обеспечивает сдвиг в изоформах тяжелых цепей миозина (соотношение MYH7/6). На моделях сердечной недостаточности после перенесенного инфаркта миокарда у свиней было обнаружено, что CDR132L излечивает подострую и хроническую сердечную недостаточность.

CDR132L также не обладает значительной токсичностью в отношении линии клеток печени человека и изолированных кардиомиоцитов новорожденных крыс. С помощью исследований токсичности *in vivo*, проведенных на крысах и мини-свиньях, было обнаружено, что активный агент хорошо переносится даже при высоких дозах 20 и 40 мг/кг, соответственно.

Фармакокинетические исследования, включающие внутривенное или подкожное введение CDR132L здоровым крысам и здоровым свиньям, подтвердили дозозависимость уровней CDR132L в ткани.

Кроме того, было показано, что CDR132L проявляет превосходные эффекты по сравнению с другими аналогами олигонуклеотидов, имеющими такую же нуклеотидную последовательность, но другое распределение строительных блоков LNA.

В дополнительном исследовании авторы настоящего изобретения идентифицировали антифибротические терапевтические эффекты олигонуклеотидного аналога CDR132L на мышинной модели инфаркта миокарда *in vivo* и на моделях фиброза печени и фиброза легких *in vitro*.

Кроме того, была обнаружена значимая взаимосвязь между количеством miR-132 в циркулирующих биологических жидкостях и терапевтической эффективностью CDR132L.

Таким образом, количество miR-132 в биологической жидкости является важным биомаркером для мониторинга терапии.

На основании приведенных выше результатов был разработан протокол клинического исследования фазы Ib для введения CDR132L пациентам-людям, страдающим хронической сердечной недостаточностью. Между тем, это клиническое исследование Ib фазы было успешно завершено.

Таким образом, олигонуклеотид CDR132L можно применять в качестве активного агента в медицине, в частности, для профилактики или лечения сердечных нарушений и/или фиброзных нарушений.

Соответственно, первый аспект настоящего изобретения обеспечивает аналог олигонуклеотида, содержащий последовательность формулы I:



где А, Т, G и С представляют собой дезоксирибонуклеотидные строительные блоки, и где по меньшей мере один строительный блок G или Т представляет собой строительный блок мостикового нуклеотида. Этот олигонуклеотид является особенно подходящим для профилактики и/или лечения нарушения, более конкретно, сердечного нарушения у человека.

В конкретном варианте осуществления олигонуклеотид содержит или имеет последовательность формулы II:



где А, Т, G и С представляют собой дезоксирибонуклеотидные строительные блоки, и где +G и +T представляют собой строительные блоки мостиковых нуклеотидов и/или морфолиновые нуклеотидные строительные блоки, в частности, где +G и +T представляют собой строительные блоки заблокированной нуклеиновой кислоты (LNA). Этот олигонуклеотид является особенно подходящим для профилактики или лечения нарушения, в частности, сердечного или фиброзного нарушения, у человека.

Аналог олигонуклеотида формулы I или формулы II может содержать по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь, например, межнуклеозидную связь, которая стабилизирована против расщепления нуклеазами, например, фосфоротиоатную или фосфородиамидатную связь. В конкретных вариантах осуществления все межнуклеозидные связи представляют собой модифицированные связи, в частности, фосфоротиоатные связи.

В более конкретном варианте осуществления изобретение относится к олигонуклеотиду CDR132L, как описано в настоящей заявке.

Олигонуклеотид CDR132L имеет последовательность формулы III:



где dA представляет собой 2'-дезоксиаденозин, dG представляет собой 2'-дезоксигуанозин, dC представляет собой 2'-дезоксцитидин и Т представляет собой тимидин, причем +Т представляет собой строительный блок LNA-Т и +G представляет собой строительный блок LNA-G, и где \* представляет собой фосфоротиоатную связь. Этот олигонуклеотид является особенно подходящим для профилактики или лечения нарушения, в частности, сердечного или фиброзного нарушения, у человека.

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей в качестве активного агента аналог олигонуклеотида, содержащий последовательность формулы I, II или III и фармацевтически приемлемый носитель, в частности, для применения в профилактике или лечении нарушения, в частности, сердечного или фиброзного нарушения, у человека.

Как описано выше, аналог олигонуклеотида, содержащий последовательность

формулы I, II или III, является подходящим для медицинского применения.

В некоторых вариантах осуществления медицинское применение относится к применению для лечения или профилактики нарушения, связанного с патологической экспрессией miR-132, сопровождаемого и/или вызванного ею. В некоторых вариантах осуществления медицинское применение относится к лечению или предупреждению сердечных нарушений, в частности, нарушений, связанных с гипертрофией сердца. В некоторых вариантах осуществления медицинское применение относится к лечению фиброзных нарушений, например, нарушений, связанных с патологическим фиброзом, сопровождаемых и/или вызванных им, в частности, фиброзных нарушений сердца, фиброзных нарушений легких или фиброзных нарушений печени.

Олигонуклеотид формулы I, II или III может состоять из строительных блоков дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и мостиковых нуклеотидных строительных блоков. «Мостиковый нуклеотид» относится к модифицированному рибонуклеотиду, в котором рибозный фрагмент содержит мостик из двух или трех атомов, соединяющий 2'-атом кислорода и 4'-атом углерода. Например, мостик может содержать структуру 2'-O-CH<sub>2</sub>-4', 2'-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-4', 2'-O-CH(CH<sub>3</sub>)-4' или соответствующую структуру, в которой O заменен на S или NH. В конкретном варианте осуществления по меньшей мере один мостиковый нуклеотидный строительный блок представляет собой строительный блок LNA, имеющий 2'-O-CH<sub>2</sub>-4'-мостик.

Олигонуклеотид формулы I, II или III имеет длину по меньшей мере 16 строительных блоков, например, длину от 16 до 20 строительных блоков. В конкретном варианте осуществления олигонуклеотид формулы I, II или III имеет длину 16 строительных блоков.

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид формулы I, II или III содержит 5-10, например, 6-8, в частности, 7 мостиковых нуклеотидных строительных блоков, например, строительных блоков LNA.

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид формулы I, II или III представляет собой голый олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может быть конъюгирован по меньшей мере с одним гетерологичным фрагментом, например фрагментом, который не способствует связыванию олигонуклеотида с miR-132. Гетерологичный фрагмент может представлять собой фрагмент, который улучшает нацеливание и/или клеточное поглощение, например липидный фрагмент, такой как холестерин или жирная кислота, сахаридный или аминсахаридный фрагмент, такой как фрагмент, содержащий N-галактозамин, пептидный или полипептидный фрагмент, или же нуклеозидный или нуклеотидный фрагмент, такой как аптамер. Гетерологичный фрагмент может быть конъюгирован с 5'- и/или 3'-концом аналога олигонуклеотида посредством ковалентной связи или спейсера.

Олигонуклеотид по настоящему изобретению является подходящим для применения в медицине, включая медицину человека и ветеринарию. В некоторых вариантах осуществления он является полезным для профилактики или лечения нарушения, связанного с патологической экспрессией miR-132, сопровождаемого и/или вызванного ею, например, связанного со сверхэкспрессией miR-132. Было обнаружено, что введение олигонуклеотида значительно снижает экспрессию miR-132 *in vitro* и *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид можно вводить пациентам, у которых наблюдается сверхэкспрессия miR-132 по сравнению со здоровыми субъектами. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид можно вводить пациентам, у которых не наблюдается сверхэкспрессия miR-132 по сравнению со

здоровыми субъектами, но которые все еще нуждаются в снижении уровня miR-132.

Термин «профилактика» в контексте настоящего изобретения относится к введению олигонуклеотида пациенту, о котором известно, что он имеет повышенный риск развития определенного нарушения. Термин «лечение» в контексте настоящего изобретения  
5 относится к введению олигонуклеотида пациенту, у которого уже развились признаки и/или симптомы определенного нарушения. Термин «пациент» относится к субъекту, нуждающемуся во введении олигонуклеотида по изобретению, а именно к человеку или ветеринарному пациенту. В конкретных вариантах осуществления пациентом является человек.

10 В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид по настоящему изобретению полезен для профилактики или лечения сердечных нарушений, в частности, нарушений, связанных с гипертрофией сердца. Например, олигонуклеотид является полезным для профилактики или лечения сократительной дисфункции, сердечной декомпенсации, сердечной недостаточности, или же для профилактики или лечения ремоделирования  
15 сердца после инфаркта миокарда, миокардита, заболеваний клапанов сердца, таких как аортальный стеноз или недостаточность митрального клапана, генетических сердечных нарушений с гипертрофией сердца, например, гипертрофической необструктивной и обструктивной кардиомиопатии или болезни Фабри. Кроме того, олигонуклеотид является полезным для профилактики или лечения сердечного фиброза.

20 Олигонуклеотид является полезным для введения пациентам, выбранным из:

- (i) пациентов с повышенным риском развития сердечной недостаточности,
- (ii) пациентов, страдающих (застойной) сердечной недостаточностью, например, пациентов с повышенным риском прогрессирования сердечной недостаточности,
- (iii) пациентов, перенесших инфаркт миокарда, и/или

25 (iv) пациентов с врожденными пороками сердца, связанными с гипертрофией сердца, такими как стеноз аорты и/или легочной вены, дефекты перегородки предсердий или межжелудочковой перегородки сердца.

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, в частности, CDR132L, является полезным для введения людям, страдающим острой сердечной  
30 недостаточностью, подострой сердечной недостаточностью или хронической и/или ухудшающейся хронической сердечной недостаточностью.

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, в частности, CDR132L, является полезным для введения людям, страдающим стабильной сердечной недостаточностью, например, стабильной сердечной недостаточностью неишемического  
35 и/или ишемического происхождения.

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, в частности, CDR132L, является полезным для введения людям, страдающим сердечной недостаточностью неишемического и/или ишемического происхождения.

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, в частности, CDR132L,  
40 является полезным для введения людям, страдающим менее запущенной стадией сердечной недостаточности и сердечной недостаточностью поздней стадии.

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, в частности, CDR132L, является полезным для введения людям, страдающим сердечной недостаточностью I, II, III и/или IV стадий в соответствии с классификацией Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA), например, пациентам, страдающим сердечной недостаточностью I и/или II стадии согласно NYHA, пациентам, страдающим сердечной недостаточностью I, II и/или III стадии согласно NYHA, или пациентам, страдающим сердечной недостаточностью III и/или IV стадии согласно NYHA.

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, в частности, CDR132L, является полезным для введения людям, страдающим сердечной недостаточностью и имеющим имплантированный аппарат искусственного кровообращения, например, устройство поддержки левого желудочка (LVAD).

5 В конкретном варианте осуществления олигонуклеотид является полезным для профилактики и/или лечения левосторонней сердечной недостаточности, включая систолическую сердечную недостаточность, диастолическую сердечную недостаточность и состояние, связанное с систолической сердечной недостаточностью и/или диастолической сердечной недостаточностью.

10 Систолическая сердечная недостаточность относится к типу сердечной недостаточности, связанной со сниженной фракцией выброса, в частности, с фракцией выброса 40% или менее, при которой левый желудочек теряет свою способность нормально сокращаться. Введение олигонуклеотида по изобретению при лечении систолической сердечной недостаточности может привести к стабилизации, увеличению  
15 и/или нормализации фракции выброса. Олигонуклеотид по изобретению является подходящим для введения пациентам с риском развития систолической дисфункции, например, пациентам, страдающим гипертензией или блокадами коронарных артерий.

Диастолическая сердечная недостаточность относится к типу сердечной недостаточности, связанной с нарушенной релаксацией левого желудочка с увеличением  
20 или без увеличения давления заполнения. Во многих случаях диастолическая сердечная недостаточность связана с сохраненной фракцией выброса. Введение олигонуклеотида по изобретению при лечении диастолической сердечной недостаточности может привести к стабилизации, улучшению и/или нормализации релаксации левого желудочка. Соединение по изобретению является подходящим для введения пациентам с риском  
25 развития диастолической дисфункции, например, пациентам, страдающим гипертензией, гиперлипидемией, диабетом, синдромом обструктивного апноэ во сне, сердечными болезнями накопления, наследственной сердечной недостаточностью (например, мутациями в гене титина или в генах других структурных генах).

В дополнительном конкретном варианте осуществления соединение является  
30 полезным для профилактики и/или лечения правосторонней сердечной недостаточности, в частности, правосторонней сердечной недостаточности, которая возникает в результате левосторонней сердечной недостаточности.

В некоторых вариантах осуществления соединение по настоящему изобретению является полезным для предупреждения или лечения фиброзных нарушений, в частности,  
35 нарушений, связанных с патологическим фиброзом, сопровождаемых и/или вызванных им.

Патологический фиброз представляет собой образование избыточной волокнистой соединительной ткани в органе или ткани, в частности, связанное с патологическим состоянием, сопровождаемое и/или вызванное им. Патологический фиброз может  
40 возникать во многих различных органах и тканях тела, как правило, в результате воспаления или повреждения.

В определенном варианте осуществления фиброз представляет собой сердечный фиброз, например, состояние, сопровождаемое патологическим фиброзом в сердце. Иллюстративные типы сердечного фиброза включают фиброз предсердий,  
45 эндомикардиальный фиброз или фиброз, возникающий в результате перенесенного инфаркта миокарда.

В дополнительном варианте осуществления фиброз представляет собой легочный фиброз, например, состояние, сопровождающееся патологическим фиброзом в легких.

Иллюстративные типы легочного фиброза включают фиброзные нарушения, вызванные профессиональными факторами или факторами окружающей среды, например, воздействием токсинов и загрязнителей, таких как кремнеземная пыль, волокна асбеста, металлическая пыль, угольная пыль, зерновая пыль, птичий и животный помет. Другие типы легочных фиброзных нарушений вызваны радиационной терапией и/или лечением лекарственными средствами, такими как химиотерапевтические лекарственные средства, сердечные лекарственные средства, антибиотики или противовоспалительные лекарственные средства. Еще другие типы легочных фиброзных нарушений вызваны нарушениями, включающими идиопатический легочный фиброз, дерматит, полимиозит, смешанное заболевание соединительной ткани, аутоиммунное заболевание, такое как ревматоидный артрит, склеродермия, синдром Шегрена или системная красная волчанка, саркоидоз, пневмония или вирусная инфекция, гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (GERD).

В дополнительном варианте осуществления фиброз может представлять собой печеночный фиброз, например, состояние, сопровождающееся патологическим фиброзом в печени. Иллюстративные типы печеночного фиброза вызваны вирусной инфекцией, например, вирусом гепатита В и/или С, наследственными нарушениями обмена веществ, аутоиммунным гепатитом, обструкцией желчевыводящих путей, перенасыщением железом, неалкогольной жировой болезнью печени, включая неалкогольную жировую болезнь печени (NAFL) и неалкогольный стеатогепатит (NASH), и алкогольной болезнью печени.

В еще других вариантах осуществления фиброз также может представлять собой сосудистый фиброз, например, артериальную ригидность, кожный фиброз, например, образование келоидов или нефрогенный системный фиброз, артрофиброз, некоторые формы адгезивного капсулита, фиброз мягких тканей, такой как фиброз средостения или фиброз забрюшинного пространства, или фиброз костного мозга, такой как миелофиброз.

В некоторых вариантах осуществления изобретение включает определение количества и/или активности конкретных физиологических параметров у субъекта, подлежащего лечению, до, во время и/или после введения олигонуклеотида по изобретению. Эта сопутствующая диагностическая процедура может содействовать медицинскому применению, как описано выше. Например, диагностическая процедура может содействовать оценке риска, стратификации пациентов, мониторингу во время курса лечения и/или контролю после лечения.

В некоторых вариантах осуществления изобретение включает определение количества и/или активности miR-132 у субъекта, подлежащего лечению, до, во время и/или после введения олигонуклеотида по изобретению. В дополнительных вариантах осуществления изобретение включает определение количества и/или активности по меньшей мере одного маркера, в частности, выбранного из сердечных маркеров и/или маркеров фиброза. В некоторых вариантах осуществления изобретение включает определение количества и/или активности сердечных маркеров, таких как BNP, например, NT-proBNP, ANP или изоформы тяжелых цепей миозина, например, отношение MYH7/6, и/или уровни FoxO3 и/или SERCA2. В конкретных вариантах осуществления изобретение включает определение количества NT-proBNP. В еще других вариантах осуществления изобретение включает определение количества и/или активности маркеров фиброза, таких как коллаген, например, отложений коллагена и/или экспрессии генов маркеров фиброза, таких как – но без ограничения - коллаген 1A1, коллаген 1A2, коллаген 3A1, C-концевой пропептид проколлагена I типа (PICP) и/или галектин-3 (Gal-3), и/или матриксная

металлопептидаза (металлопротеиназа), такая как матриксная металлопротеиназа 1 (ММП-1) и/или матриксная металлопротеиназа 2 (ММП-2).

5 Определение вышеуказанных параметров может быть осуществлено в образцах биологических жидкостей, таких как кровь, плазма или сыворотка, или в образцах тканей в соответствии с известными способами на уровне нуклеиновой кислоты и/или белка, и может дать полезную диагностическую информацию, например, по динамике заболевания и/или ходе, и/или успехе терапии.

10 Кроме того, авторы изобретения обнаружили с помощью способа на основе PCR, что количество miR132 в сердечной ткани показывает положительную корреляцию с количеством miR132 в циркулирующей биологической жидкости, например, цельной крови, плазме или сыворотке. Таким образом, измерения количества miR132 в образце биологической жидкости, например, образце цельной крови, плазмы или сыворотки указывает на количество miR132 в целевой ткани, в частности, в сердечной ткани.

15 В некоторых вариантах осуществления изобретение включает определение количества и/или активности miR-132 у субъекта, подвергаемого лечению, например, у человека во время курса терапии. Термин «курс терапии» в этом контексте следует понимать как введение соединения по изобретению, в частности, введение CDR132L нуждающемуся в этом субъекту, в частности, человеку, в течение определенного периода времени, например, периода времени, составляющего по меньшей мере один день, по меньшей мере 20 мере одну неделю, по меньшей мере две недели или по меньшей мере один месяц. Это определение можно проводить один или несколько раз во время курса терапии. В конкретных вариантах осуществления количество miR-132 определяют количественно в образце биологической жидкости, например, в образце циркулирующей биологической жидкости, таком как образец крови, плазмы или сыворотки. В частности, образец 25 представляет собой образец плазмы. Количество и/или активность miR-132 обратно пропорциональна или отрицательно коррелирует с концентрацией соединения в предполагаемом органе-мишени, в частности, в сердце, а также с его активностью и/или его терапевтической эффективностью. Таким образом, определение позволяет регулировать дозу, подлежащую введению, и/или регулировать интервал между 30 отдельными дозами. Кроме того, определение позволяет стратифицировать (разделять) пациентов по их терапевтическому ответу, например, различать отвечающих от не отвечающих. В частности, определение проводят у пациентов с хроническим заболеванием, например, пациентов с хроническим заболеванием сердца, несколько раз во время курса терапии. Например, определение можно проводить с недельными, 35 двухнедельными и/или месячными интервалами.

В некоторых вариантах осуществления изобретение включает определение изменений в параметрах ECG во время курса терапии. Параметры ECG, важные для пациентов с сердечной недостаточностью, включают, но без ограничения, измерение QRS, зубцов Т, блокады левой ножки пучка Гиса (LBBB) и/или блокады правой ножки пучка Гиса 40 (RBBB); и/или прирост зубца R. Особенно актуальным является измерение QRS.

Согласно дополнительному аспекту изобретения олигонуклеотид можно вводить в режиме «по требованию», например, путем корректировки дозы и/или временного интервала между отдельными дозами в соответствии с измеренным количеством miR132 в образце биологической жидкости. Например, если обнаруживается, что количество 45 miR132 в образце биологической жидкости превышает предварительно определенное значение, вводят новую дозу олигонуклеотида.

Таким образом, настоящее изобретение относится к олигонуклеотиду, как описано выше, для применения в профилактике или лечении сердечного нарушения у человека,

где олигонуклеотид вводят в режиме «по требованию», в частности, включающему следующие стадии:

(i) измерение количества miR132 в образце биологической жидкости, например, в образце цельной крови, сыворотки или плазмы от субъекта, подвергаемого лечению олигонуклеотидом,

(ii) введение олигонуклеотида в дозе и/или с временным интервалом между отдельными дозами, как определено в соответствии с измеренным количеством miR132 на стадии (i), в частности, новую дозу олигонуклеотида вводят, если было обнаружено, что количество miR132 в образце биологической жидкости превышает заданное значение, например, базовое значение.

Соединение по изобретению можно вводить в виде фармацевтической композиции, содержащей фармакологически приемлемый носитель. Введение можно осуществлять известными способами, когда соединение вводят в желаемую целевую клетку или орган субъекта, подлежащего лечению.

Соединение можно вводить как таковое или в виде конъюгата с гетерологичным фрагментом, как описано выше.

Для фармацевтических применений композиция может быть представлена в виде раствора, например, инъекционного раствора, эмульсии, суспензии и т.п.

Композицию можно вводить любым подходящим способом, например, парентерально, в частности, путем инъекции, такой как подкожная, внутримышечная, внутривенная или внутриартериальная инъекция, или инфузии, путем перорального или ингаляционного приема и/или путем нанесения на кожу, или путем местного нанесения на целевой орган, например, путем интракоронарной перфузии. Носитель может представлять собой любой подходящий фармацевтический носитель.

Предпочтительно используют носитель, который способен увеличивать эффективность проникновения молекул олигонуклеотида в клетки-мишени. Подходящими примерами таких носителей являются липосомы, например, катионные липосомы или предварительно сконструированные экзосомы.

В некоторых вариантах осуществления соединения, в частности, CDR132L, вводят путем внутривенной инъекции или подкожной инъекции.

Соединение вводят в фармацевтически эффективной дозировке в зависимости от пути введения и типа или тяжести заболевания.

В некоторых вариантах осуществления соединения вводят человеку в дозе около 0,1-100 мг/кг массы тела на одно применение, например, около 0,2-50 мг/кг массы тела, около 0,8-20 мг/кг массы тела на одно применение или около 3-10 мг/кг массы тела на одно применение, например, парентерально, в частности, путем инъекции или инфузии, например, путем внутривенной инъекции или путем подкожной инъекции.

В фармакокинетическом исследовании было обнаружено, что соединение имеет длительный период полужизни, составляющий около трех недель, в сердечной ткани и короткий двухфазный период полужизни в плазме. Эти результаты демонстрируют, что соединение является подходящим для множества различных режимов лечения, например, в режиме лечения, предусматривающем нанесения с временными интервалами, составляющими менее чем неделю, и в режиме лечения, предусматривающем нанесения с временными интервалами, составляющими неделю или более.

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид вводят человеку в режиме, выбранном из ежедневного введения, введения каждый второй день, введения каждый третий день и введения каждый четвертый день, в частности, когда олигонуклеотид вводят парентерально, более конкретно путем внутривенной или подкожной инъекции,

например, подкожной самостоятельной инъекции, проводимой самим пациентом.

В этих вариантах осуществления олигонуклеотид можно вводить в дозе, зависящей от массы тела, и/или в фиксированной дозе. Например, олигонуклеотид можно вводить в дозе от 0,01 мг/кг массы тела до 50 мг/кг массы тела, в дозе от 0,02 мг/кг массы тела до 10 мг/кг массы тела, или в дозе от 0,05 мг/кг массы тела до 5 мг/кг массы тела на одно применение. Альтернативно олигонуклеотид можно вводить в фиксированной дозе от 1 мг до 5000 мг, в фиксированной дозе от 2 мг до 1000 мг или в фиксированной дозе от 5 мг до 500 мг на одно применение.

В других вариантах осуществления олигонуклеотид вводят человеку в режиме, выбранном из еженедельного введения, введения каждую вторую неделю, введения каждую третью неделю, введения каждую четвертую неделю или каждый месяц, введения каждую шестую неделю, введения каждый второй месяц, введения каждый третий месяц, введения каждый шестой месяц и введения один раз в год, в частности, когда олигонуклеотид вводят парентерально, более конкретно путем внутривенной или подкожной инъекции, например, подкожной самостоятельной инъекции пациентом.

В этих вариантах осуществления олигонуклеотид можно вводить в дозе, зависящей от массы тела, или в фиксированной дозе. Например, олигонуклеотид можно вводить в дозе от 0,01 мг/кг массы тела до 50 мг/кг массы тела, в дозе от 0,05 мг/кг массы тела до 20 мг/кг массы тела или в дозе от 0,1 мг/кг массы тела до 10 мг/кг массы тела на одно применение. Альтернативно олигонуклеотид можно вводить в фиксированной дозе от 1 мг до 5000 мг, в фиксированной дозе от 5 мг до 2000 мг или в фиксированной дозе от 10 мг до 1000 мг на одно применение.

В еще других вариантах осуществления соединение можно вводить человеку в начальной дозе, например, 1 или 2 начальных дозах, и затем по меньшей мере в одной поддерживающей дозе, которая отличается от начальной дозы. Например, начальная доза может быть выше поддерживающей дозы, например, примерно в 1,5 - 3 раза, например, примерно в 2 раза выше поддерживающей дозы. Начальную дозу и/или поддерживающую дозу можно вводить в виде дозы, зависящей от массы тела, или в виде фиксированной дозы. В конкретных вариантах осуществления начальная доза составляет около 3-10 мг/кг, и поддерживающая доза составляет около 1-7,5 мг/кг. Кроме того, поддерживающая доза может быть скорректирована, например, титрованием, исходя из количества miR132 в биологических жидкостях, таких как кровь, плазма или сыворотка.

В клиническом исследовании фазы Ib на людях было обнаружено, что соединение демонстрирует превосходную переносимость и безопасность у людей с сердечной недостаточностью при увеличении однократной и повторных доз в дополнение к стандарту лечения. Фармакокинетический профиль не показывает признаков накопления и высокого уровня линейности доз. Уникальный механизм действия олигонуклеотида при сердечной недостаточности был подтвержден важными фармакодинамическими параметрами и связыванием с мишенью. Никаких серьезных нежелательных явлений и реакций в месте инъекции не наблюдалось, и ни один пациент не выбыл из исследования из-за нежелательных явлений. Соединение хорошо переносилось и не проявляло никаких признаков токсичности в дозах до 10 мг/кг.

Соединение можно вводить в качестве монотерапии или в комбинации с дополнительным лекарственным средством, в частности, с лекарственным средством, подходящим для профилактики или лечения сердечных нарушений или фиброзных нарушений, как описано выше.

Примерами дополнительных лекарственных средств, подходящих для профилактики

или лечения сердечных нарушений, являются ангиотензин-модулирующие агенты,  $\beta$ -блокаторы, диуретики, антагонисты альдостерона, вазодилататоры, ионотропные агенты, статины, ингибиторы неприлизина или ингибиторы SGLT-2, или их комбинации, например, комбинация ингибитора неприлизина, например сакубитрила, с блокатором рецепторов ангиотензина II, например валсартаном.

В некоторых вариантах осуществления соединение вводят вместе с (i) по меньшей мере одним диуретиком, (ii) по меньшей мере одним ингибитором ангиотензинпревращающего фермента, (iii) по меньшей мере одним  $\beta$ -блокатором, необязательно (iv) блокатором рецепторов ангиотензина II и/или (v) необязательно ингибитором If-канала, таким как ивабрадин, и необязательно (vi) ингибитором рецепторов ангиотензина/неприлизина, и необязательно (vii) ингибитором натрийглюкозного котранспортера 2-го типа, таким как эмпаглифлозин и дапаглифлозин, и/или необязательно (viii) терапевтическими препаратами на основе стволовых клеток, и/или необязательно (ix) антимицроРНК, нацеленными на различные пути, и/или необязательно (x) ингибитором SGLT-2. Подходящие ингибиторы, терапевтические препараты на основе стволовых клеток и/или микроРНК, нацеленные на различные пути, могут быть выбраны специалистом в данной области. Соединения и ингибиторы согласно (i) - (x) могут быть независимо выбраны и комбинированы любым подходящим образом.

Примерами дополнительных лекарственных средств, подходящих для профилактики или лечения фиброзных нарушений, являются лекарственные средства для профилактики или лечения сердечного фиброза сердца, такие как ингибиторы АСЕ, например, лизиноприл, блокаторы рецепторов ангиотензина II, например, кандесартан, лозартан или олмесартан, антагонисты альдостерона, например, спиронолактон, и/или ингибиторы TGF  $\beta$ , например, пирфенидон или траниласт, лекарственные средства для профилактики или лечения легочного фиброза, такие как противофиброзные агенты, например, нинтеданиб или пирфенидон, противовоспалительные агенты, например, кортикостероиды, азатиоприн, циклофосфамид и микофенолят мофетил, антирефлюксные агенты, например, ингибиторы протонной помпы или блокаторы  $H_2$ , и/или противокашлевые агенты, и лекарственные средства для предупреждения и/или лечения фиброза печени, такие как ингибиторы АСЕ, например, беназеприл, лизиноприл или рамиприл, противовирусные агенты или агонисты PPAR $\alpha$ .

Кроме того, изобретение относится к применению соединения по изобретению, как раскрыто выше в настоящем описании, для изготовления лекарственного средства для профилактики или лечения сердечного нарушения.

Кроме того, изобретение относится к применению соединения по изобретению, как раскрыто выше в настоящем описании, для изготовления лекарственного средства для профилактики или лечения фиброзного нарушения.

Кроме того, изобретение относится к способу профилактики или лечения сердечного нарушения, включающего введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного соединения, как описано в настоящей заявке.

Кроме того, изобретение относится к способу профилактики или лечения фиброзного нарушения, включающему введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного соединения, как описано в настоящей заявке.

Кроме того, изобретение относится к набору для мониторинга терапии олигонуклеотидом, как описано выше, предназначенному для определения количества

и/или активности miR-132 у субъекта, которому был введен олигонуклеотид. Набор может содержать праймер, связывающийся с кодирующей miR-132 ДНК или с ДНК, которая комплементарна указанной, предпочтительно праймер hsa-miR-132, праймер, связывающийся с кодирующей miR-39 ДНК или с ДНК, которая комплементарна указанной, предпочтительно праймер cel-miR-39, и необязательно положительный контроль hsa-miR-132, и необязательно положительный контроль cel-miR-39. Согласно предпочтительному варианту осуществления праймеры hsa-miR-132 и miR-39 используют вместе. Кроме того, набор может содержать дополнительные соединения, например, qPCR Mastermix и воду, свободную от нуклеаз. В предпочтительном варианте осуществления набор включает праймер hsa-miR-132, праймер cel-miR-39, положительные контроли, указанные выше, и qPCR Mastermix, и воду, свободную от нуклеаз. Специалист в данной области может выбрать подходящие праймеры.

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно с помощью следующих фигур и примеров.

15 Пример 1. Подавление экспрессии miR-132 в кардиомиоцитах

Проводили количественный анализ *in vitro* ингибирующей микроРНК активности многочисленных аналогичных по структуре соединений, полученных из библиотеки анти-miR-132. Подавление экспрессии микроРНК количественно оценивали с помощью тестов TaqMan® и количественной ПЦР в реальном времени.

20 Исследование проводили на изолированных крысиных кардиомиоцитах после гипертрофической стимуляции путем обработки фенилэфрином/изопротеренолом при концентрациях 10 мкМ. Клетки инкубировали в течение 48 часов в стандартной среде для культивирования клеток. Тестируемые соединения вводили индивидуально при концентрации 100 нМ. Тесты проводили в трех повторах.

25 Соединение CDR132L, миксер LNA-ДНК, имеющий фосфоротиоатный остов, было идентифицировано как наиболее эффективное соединение из библиотеки структурных аналогов анти-miR-132.

Структура CDR132L выглядит следующим образом:

5'-dA\*+T\*dG\*+G\*dC\*+T\*dG\*+T\*dA\*+G\*dA\*dC\*dT\*dG\*+T\*+T-3',

30 где dA представляет собой 2'-дезоксаденозин, dG представляет собой 2'-дезоксигуанозин, dC представляет собой 2'-дезоксцитидин и T представляет собой тимидин, причем +T представляет собой строительный блок LNA-T, и +G представляет собой строительный блок LNA-G, и где \* представляет собой фосфоротиоатную связь.

Пример 2. Токсикологический анализ

35 2.1 Цель исследования. Определение профиля токсичности CDR132L

2.2 План исследования

Анализ цитотоксичности *in vitro* проводили на клетках печени человека (HepG2) и изолированных неонатальных кардиомиоцитах (NRCM). Для оценки цитотоксичности использовали коммерческий колориметрический МТТ-тест. После добавления индивидуальных соединений клетки инкубировали в среде DMEM в течение 48 ч. Эффект CDR132L (красный) сравнивали со скремблированным (scrambled) олигонуклеотидом LNA, используемым в качестве контроля (синий), в диапазоне доз 0,01-100 мкМ. Серым цветом выделен диапазон терапевтических доз.

45 2.3 Результаты. Не было обнаружено значительной токсичности CDR132L в клетках HepG2 и NRCM в диапазоне терапевтических доз (см. фигуры 1A и 1B).

Пример 3. Обратное ремоделирование левого желудочка при сердечной недостаточности у трансгенных модельных мышей путем введения CDR132L

3.1 Цель исследования. Тестирование эффективности CDR132L в отношении реверсии

сердечной недостаточности на мышинной модели сердечной недостаточности.

### 3.2 План исследования

Модель сердечной гипертрофии: Трансгенные (TG) мыши со сверхэкспрессией сердечной miR-132 (Ucar et al. 2012).

5 Лечение: еженедельно 20 мг/кг внутривентриально CDR132L или плацебо (см. фиг. 2A).

Группы: одноплетники дикого типа (WT) +плацебо, WT+CDR132L, TG +плацебо, TG+CDR132L. n = 6/группу.

10 Уровни экспрессии miR-132 определяли с помощью qPCR. Статистический тест: непарный t-критерий. (фигура 2B).

\*\*p <0,01, n = 6/группу.

### 3.3 Результаты

Репрезентативные изображения сердца, полученные методом эхокардиографии (фигура 3A).

15 CDR132L изменяет гипертрофию, как измерено по массе сердца и конечному диастолическому объему (LVEDV) (фигура 3B).

CDR132L улучшает региональную сократительную функцию в большинстве сегментов левого желудочка (LV) (AB, передний базальный; AM, средний передний; AA, передний верхушечный; PA задний верхушечный; PM, средний задний и PB, задний базальный)

20 (фигура 3C).

Пример 4. Введение CDR132L модельным мышам с сердечной недостаточностью после инфаркта миокарда

4.1 Цель исследования. Тестирование эффективности CDR132L на мышинной модели сердечной недостаточности после инфаркта миокарда.

25 4.2 План исследования

Мышиная модель инфаркта миокарда (ИМ): постоянное лигирование коронарной артерии (LAD) у мышей C57BL/6N (Kolk et al., 2009).

Группы: ИМ или ложноплетированные, подвергнутые лечению CDR132L или плацебо. Лечение: 20 мг/кг внутривентриально на день 7 и 14 после ИМ.

30 Конечная точка исследования: функция LV на день 28 после ИМ. n = 6-7/группу. (фигура 4).

### 4.3 Результаты

35 Лечение с помощью CDR132L улучшило дисфункцию левого желудочка после ИМ (фигура 5A). Также, улучшились независимые от нагрузки параметры систолической сократительной функции (фигура 5B) (\*p <0,05).

Лечение с помощью CDR132L также улучшило продольную скорость деформации (LSR) и, таким образом, изменило сократительную дисфункцию после ИМ в отдельных сегментах сердца в удаленной области сердца. (\*p <0,05) (фигура 6).

40 Лечение с помощью CDR132L эффективно подавляет экспрессию miR-132 в сердечных тканях, например, в удаленной (неинфарктной) области и перинфарктной зоне (фигура 7A).

На гистологическом уровне CDR132L уменьшает размер кардиомиоцитов в удаленной области сердца после ИМ (фигура 7B).

45 На тканевом уровне CDR132L снижает экспрессию сигнала сердечного стресса ANP в сердце после ИМ (фигура 7C).

Пример 5. Тестирование CDR132L на модели сердечной недостаточности после перенесенного инфаркта миокарда у свиней

5.1. Цель исследования. Подтверждение эффективности in vivo CDR132L на клинически

значимой модели постмиокардиального инфаркта

### 5.2 План исследования

• модель инфаркта миокарда у свиней, вызванного 90-минутной ишемией (окклюзия LAD) и последующей реперфузией;

5 • группы: плацебо или CDR132L, n = 6 на группу;

• лечение: дважды, на день 3 и 28 после МИ, 0,3 мг/кг внутрикороноарно и 0,5 мг/кг внутривенно, соответственно (фигура 8);

• конечная точка: 8 недель после ИМ. Первичные критерии оценки: ремоделирование EF и LV.

### 10 5.3 Результаты

• Лечение с помощью CDR132L предотвращает дезадаптивное ремоделирование и улучшает функцию, что определяется путем измерения конечного диастолического объема, конечного систолического объема, фракции выброса и функции левого желудочка (фигуры 9A-D).

15 • Лечение с помощью CDR132L улучшает сегментарную сократимость в сегментах, соответствующих жизнеспособному/внеинфарктному миокарду; МРТ сердца в конечной точке: n = 6/группу, красная область: p <0,05 (фигура 9E).

• Лечение с помощью CDR132L предотвращает дезадаптивное ремоделирование и улучшает жизнеспособность LV в апикальной области, как определено с помощью 20 NOGA, электроанатомического картирования в конечной точке: n=6/группу, плацебо по сравнению с CDR132L: p <0,05 (фигура 10).

• CDR132L нормализует экспрессию в тканях маркеров патологической сердечной недостаточности ANP и BNP и обеспечивает сдвиг в изоформах тяжелых цепей миозина, то есть соотношение MYH7/6 (фигура 11).

25 • На гистологическом уровне лечение с помощью CDR132L эффективно снижает гипертрофию кардиомиоцитов на репрезентативных микрофотографиях отдаленных областей LV (20x окрашивание WGA/DAPI) (фигура 12A) и графическое изображение (фигура 12B), n=6/группу, плацебо по сравнению с CDR132L: p <0,05.

Пример 6. Фармакодинамический профиль/связывание с мишенью CDR132L у свиней

### 30 6.1 План исследования

Лечение: однократно, день 0, интракороноарная перфузия 0,5 мг/кг или 5 мг/кг, n=3 свиньи/группу, плацебо по сравнению с CDR132L: p <0,05.

• Анализ методом qPCR микроРНК в тканях в конечной точке (через 24 часа после лечения).

### 35 6.2 Результаты

• Лечение с помощью однократной дозы CDR132L дозозависимо подавляет уровни сердечной miR-132 (фигура 13).

Пример 7. Токсикологическое исследование органов

### 40 7.1 План исследования

• Лечение: дважды, на день 3 и 28 после МИ, 0,3 мг/кг внутрикороноарно и 0,5 мг/кг внутривенно соответственно.

• Серийное взятие крови, конечная точка: через 72 часа после лечения, n=6 свиней/группу, плацебо по сравнению с CDR132L: p <0,05.

### 7.2 Результаты

45 • Лечение с помощью CDR132L in vivo не вызывает какой-либо токсичности в органах у свиней (фигура 14).

Последующие исследования токсичности повторных доз проводили на крысах и мини-свиньях. Согласно 4-недельному исследованию токсичности на крысах с

использованием внутривенной болюсной инъекции CDR132L в дозах 4, 20 и 100 мг/кг на дни 1 и 28, с последующим 4-недельным периодом восстановления, «уровень отсутствия наблюдаемых побочных эффектов» (NOAEL) у крыс составил 20 мг/кг. Это соответствует эквивалентной дозе для человека 3,23 мг/кг массы тела.

5 Согласно 4-недельному исследованию токсичности на мини-свиньях с использованием внутривенной болюсной инъекции CDR132L в дозе 4, 20 и 40 мг/кг в дни 1 и 28, с последующим 4-недельным периодом восстановления, «уровень, при котором эффекта не наблюдается» (NOEL) у мини-свиней составил 40 мг/кг. Это соответствует эквивалентной дозе для человека 36,36 мг/кг массы тела.

10 **Пример 8. Сердечные уровни мРНК FoxO3 и SERCA2 у модельных мышей с сердечной недостаточностью**

Сердечные уровни мРНК FoxO3 и Serca2 измеряли у контрольных и miR-132 TG мышей, получавших внутривенную инъекцию контрольного скремблированного олигонуклеотида или CDR132L еженедельно, 4 раза. Все значения представляют собой среднее значение  $\pm$  SEM (стандартная ошибка среднего). \* P < 0,05 (фигуры 15A и 15B).

**Пример 9. Сравнение различных олигонуклеотидов**

Цель этого исследования состоит в оценке терапевтического эффекта нового ингибитора miR-132-3p CDR132L в соответствии с настоящим изобретением с двумя эталонными олигонуклеотидами. Два эталонных олигонуклеотида имеют такую же олигонуклеотидную последовательность и фосфоротиоатный остов, что и CDR132L, но различаются распределением строительных блоков LNA в молекуле. CDR2u1 содержит два строительных блока LNA на 5' и 3' конце, в то время как для CDR301 каждый нуклеотид несет строительный блок LNA.

Для тестирования эффективности различные олигонуклеотиды вводили в кардиомиоциты новорожденных крыс (NRCM). Эффекты этого лечения отслеживали с помощью количественной ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) после изменений в экспрессии miR-132-3p и ее известного гена-мишени FoxO3 (Forkhead box O3).

Схема эксперимента и результаты показаны на фигуре 16. (A) Общая схема эксперимента. Кардиомиоциты новорожденных крыс высеивали в день 0 и обрабатывали олигонуклеотидами CDR132L, CDR2u1 или CDR301 (по 100 нМ каждый) в день 1. В качестве конечной точки клетки собирали для анализа экспрессии генов. (B) Уровни экспрессии miR-132-3p после обработки CDR132L, CDR2u1 или CDR301. (C) Уровни экспрессии гена-мишени miR-132-3p Forkhead box O3 (FoxO3) после обработки CDR132L, CDR2u1 или CDR301. Данные представляют собой среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (SD). P-значения олигонуклеотидов по сравнению с плацебо определяли с помощью двустороннего критерия Стьюдента.

Лечение NRCM с помощью CDR132L и CDR301 привело к значительному снижению уровней miR-132-3p на 96%, тогда как CDR2u1 уменьшил экспрессию микроРНК на 30% (фиг. 16A-B). Кроме того, лечение с помощью CDR132L привело к значительному подавлению гена-мишени Foxo3 miR-132-3p, чего не удалось достичь с помощью CDR2u1 и CDR301 (фиг. 16C).

Таким образом, полученные данные демонстрируют превосходный ингибирующий эффект CDR132L по сравнению с CDR2u1 и CDR301, о чем свидетельствуют значительно пониженные уровни экспрессии miR-132-3p и существенное подавление ее гена-мишени FoxO3.

**Пример 10. Эффекты CDR132L при сердечном фиброзе**

Целью этого исследования являлась оценка антифибротических терапевтических эффектов CDR132L на модели фиброза *in vivo*.

Для доказательства антифибротической активности *in vivo* использовали мышиную модель инфаркта миокарда (МИ) путем постоянного лигирования левой передней нисходящей коронарной артерии (LAD) у мышей C57BL/6N. Лечение с помощью CDR132L применяли на день 7 и 14, плацебо (скремблированный олигонуклеотидный аналог CDR132L, 20 мг/кг) и CDR132L (20 мг/кг). Группы включали контрольную оперированную группу (ложнооперированные мыши) и LAD-лигированных мышей (ИМ), получавших плацебо или CDR132L: ложнооперированные + плацебо, ложнооперированные + CDR132L, ИМ + плацебо, ИМ + CDR132L.  $n = 6-7$ /группу. Схема эксперимента представлена на фиг. 17. Оценка антифибротического эффекта CDR132L *in vivo* при сердечной недостаточности после ИМ показана на фиг. 18. Фиброз (показанный в виде % отложения коллагена, обнаруженного по окрашиванию пикросириусом красным (PSR) и экспрессии гена альфа-1 цепи коллагена III типа (Col3a1) относительно  $\beta$ -актина) были ослаблены после ИМ путем лечения с помощью CDR132L. Группы включали контрольную оперированную группу (ложнооперированные мыши) и LAD-лигированных мышей (ИМ), получавших либо плацебо (черный столбец), либо CDR132L (белый столбец): ложнооперированные + плацебо, ложнооперированные + CDR132L, ИМ + плацебо, ИМ + CDR132L. Статистический тест (непарный t-критерий) проводили между мышами ИМ, получавшими плацебо или CDR132L.  $** p < 0,01$ ,  $n = 6-7$ /группу.

В соответствии с результатами гистологического исследования фиброз уменьшился после лечения с помощью CDR132L (фиг. 18А). Это подтверждается на молекулярном уровне снижением экспрессии генов маркеров фиброза, таких как альфа-1 цепь коллагена III типа (Col3a1) (фиг. 18В).

Пример 11. Эффекты CDR132L при фиброзе легких и печени

Антифибротический эффект CDR132L тестировали *in vitro* на моделях фиброза легких и печени. Для этого первичные фибробласты человека, полученные из печени (первичные фибробласты печени человека, HPLF, PeloBiotech) и легких (нормальные первичные фибробласты легких человека, NHLF, Lonza), стимулировали профибротическими агентами и подвергали лечению с помощью CDR132L. Терапевтические эффекты CDR132L контролировали, наблюдая за ключевыми процессами фиброзного пути, включая скорость пролиферации и изменение экспрессии генов маркеров фиброза в конечной точке. Кроме того, оценивали экспрессию miR-132-3p, чтобы доказать эффективность лечения с помощью CDR132L.

Для определения пролиферации клеток использовали набор для выявления клеточной пролиферации путем ELISA (иммуоферментный анализ), предоставленный фирмой Roche. Этот колориметрический анализ позволяет количественно оценить пролиферацию клеток на основе измерения BrdU (бромдезоксипридина), включенного во вновь синтезированную ДНК пролиферирующих клеток. Количество включенного BrdU детектировали и количественно определяли. Значения абсорбции напрямую коррелируют с объемом синтеза ДНК и, таким образом, с количеством пролиферирующих клеток в соответствующих микрокультурах. Экспрессию генов оценивали с помощью количественной ПЦР в реальном времени (qRT-PCR), измеряя уровни экспрессии miR-132-3p и фиброзных маркеров, включая коллаген 1A1 (COL1A1), коллаген 1A2 (COL1A2) и матриксную металлопептидазу 2 (MMP2).

Фиг. 19 относится к модели фиброза печени *in vitro*: (А) Общая схема эксперимента. Первичные фибробласты печени человека (HPLF), предоставленные фирмой PeloBiotech, высевали в день 0 и обрабатывали фибротическим стимулом (10 нг/мл TGF- $\beta$  в нормальной ростовой среде (полная среда для фибробластов с добавлением 10% FBS))

и CDR132L (100 нМ) в день 1. В конечной точке оценивали пролиферацию клеток и экспрессию генов маркеров фиброза. (B) Уровни экспрессии miR-132-3p после лечения с помощью CDR132L. (C) Пролиферация, оцененная путем мониторинга включения BrdU во время синтеза ДНК. Реагент BrdU добавляли в среду за 20 ч до конечной точки.

5 (D) Уровни экспрессии маркерных генов фиброза (коллаген 1A1 (COL1A1), коллаген 1A2 (COL1A2) и матриксная металлопептидаза 2 (MMP2)). На (B) и (D) пунктирная линия указывает уровень экспрессии нестимулированных контрольных клеток. Данные представляют собой средние значения  $\pm$  SD. P-значения CDR132L по сравнению с контролем определяли с помощью двустороннего t-критерия Стьюдента.

10 Стимуляция NHLF трансформирующим фактором роста бета (TGF- $\beta$ ) (фиг. 19A) привела к небольшой индукции miR-132-3p, которая была значительно снижена путем лечения с помощью CDR132L (фиг. 19B). Кроме того, это соединение уменьшило пролиферацию фибробластов (фиг. 19C) и экспрессию генов фиброза, включая COL1A1, COL1A2 и MMP2 (фиг. 19D).

15 Фиг. 20 относится к модели *in vitro* фиброза легких: (A) Общая схема эксперимента. Нормальные фибробласты легких человека (предоставленные компанией Lonza) высевали в день 0 и обрабатывали фиброзным стимулом (высокое содержание FBS (5%) в среде для роста фибробластов и CDR132L (100 нМ) в день 1. В конечной точке наблюдали пролиферацию клеток и экспрессию генов. (B) Уровни экспрессии miR-132-

20 3p после лечения с помощью CDR132L. (C) Пролиферацию оценивали путем мониторинга включения BrdU во время синтеза ДНК. Реагент BrdU добавляли в среду за 20 ч до конечной точки. В (B) пунктирная линия указывает уровень экспрессии нестимулированных контрольных клеток. Данные представляют собой среднее значение  $\pm$  SD. P-значения CDR132L по сравнению с контролем определяли с помощью

25 двустороннего t-критерия Стьюдента.

В клетках NHLF после фиброзной стимуляции высоким уровнем FBS (5% по сравнению с нормальными условиями роста при 2% FBS) (фиг. 20A) не наблюдалось повышения miR-132-3p (фиг. 20B). Тем не менее лечение с помощью CDR132L привело к значительному снижению целевой микроРНК (фиг. 20B) и пролиферации фибробластов

30 (фиг. 20C).

Таким образом, полученные данные демонстрируют значительный антифибротический эффект олигонуклеотида CDR132L в фибробластах, происходящих из печени или легких, а также в сердечной ткани. Авторы предполагают, что этот эффект может быть основан на антипролиферативной способности лекарственного средства

35 и/или на его воздействии на экспрессию белка внеклеточного матрикса.

Пример 12. Протокол и результаты клинического исследования на людях

#### 12.1 Протокол

##### Обоснование

40 Современная фармакотерапия сердечной недостаточности в основном ограничивается менее запущенными стадиями заболевания (стадия I и II согласно Нью-Йоркской кардиологической ассоциации; I/II NYHA). Однако лекарственные средства не могут предотвратить прогрессирование до поздних стадий (III и IV согласно NYHA), которые ассоциированы с частыми госпитализациями и одногодичной летальностью, превышающей 70% (13). В крайнем случае, имплантированные помпы (вспомогательные

45 устройства для левого желудочка, LVAD) и, в конечном итоге, трансплантация сердца могут быть единственными вариантами спасения жизни для очень небольшого числа пациентов с сердечной недостаточностью в терминальной стадии.

Таким образом, срочно необходимы новые, эффективные, останавливающие болезнь

терапевтические средства, которые снижают смертность и количество госпитализаций, чтобы дать пациентам надежду на исцеление. Подход авторов настоящего изобретения предлагает новую возможность революционизировать медицинскую практику, улучшить уход за пациентами и снизить затраты на лечение сердечной недостаточности.

5       Механизм действия CDR132L включает следующие ключевые элементы, лежащие в основе его роли в качестве лекарственного средства следующего поколения при сердечной недостаточности:

- а) нормализация аберрантных уровней miR-132 в сердце,
- б) нормализация кальциевых сигналов и сократимости, а также сердечной функции,
- 10       с) улучшение сердечной аутофагии и гомеостаза, и
- д) ослабление дезадаптивного ремоделирования сердца.

Результаты доклинических исследований показали, что профиль безопасности CDR132L является подходящим для использования в клинических испытаниях.

15       Таким образом, в этом исследовании планируется оценить безопасность, фармакокинетику и некоторые фармакодинамические параметры у пациентов со стабильной сердечной недостаточностью ишемического происхождения (NYHA I-III) на основе значительных терапевтических эффектов, продемонстрированных в клинически значимом исследовании на крупных животных. Для этого исследования планируется применить схему увеличения дозы.

20       Основная цель

- Оценка безопасности одной однократной и одной повторной дозы CDR132L у пациентов со стабильной сердечной недостаточностью ишемического происхождения (стадии I, II и III согласно NYHA).

Вторичная цель

25       • Характеристика фармакокинетического (PK) профиля CDR132L у пациентов со стабильной сердечной недостаточностью ишемического происхождения.

Поисковая цель

- Определение эффекта CDR132L на фармакодинамические (PD) параметры.

Первичные конечные точки

- 30       • Первичной конечной точкой является безопасность CDR132L, измеряемая на основе:
- частоты возникновения и тяжести нежелательных явлений, возникающих в связи с лечением (TEAE),
  - доли субъектов с клинически значимыми изменениями в лабораторных тестах на безопасность (гематология, биохимия, коагуляция и анализ мочи),
  - 35       • доли субъектов с отклонениями показателей морфологии и/или ритма на электрокардиограмме (ECG),
  - доли субъектов с клинически значимыми изменениями временных интервалов ECG (интервалы PR, QRS, QT и QTc),
  - доли субъектов с клинически значимыми изменениями показателей жизненно
  - 40       важных функций (систолическое артериальное давление, диастолическое артериальное давление и частота пульса),
  - доли субъектов с клинически значимыми изменениями маркеров поражения таких органов, как сердце (высокочувствительный сердечный тропонин T), почки (креатинин) и печень (аспартаттрансаминаза и аланинтрансаминаза) и противоотечных показателей
  - 45       (натрийуретический N-концевой пептид b-типа).

Вторичные конечные точки

Параметры PK, оцененные некомпартментными методами анализа, включая максимальную наблюдаемую концентрацию в плазме ( $C_{max}$ ), время достижения

максимальной концентрации в плазме ( $t_{max}$ ), площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени от нулевого момента времени до последней поддающейся определению концентрации в плазме ( $AUC_{0-t}$ ), площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от нулевого момента времени, экстраполированного на бесконечность ( $AUC_{0-inf}$ ), клиренс крови (CL), константа скорости терминальной элиминации ( $\lambda_z$ ), конечный период полувыведения ( $t_{1/2}$ ), объем распределения ( $V_{dss}$ ).

Поисковые конечные точки

- Параметры PD, включая, но без ограничения, следующие биомаркеры: микроРНК 132 (miR-132) для связывания с мишенью, пронатрийуретический N-концевой пептид b-типа (NT-pro-BNP) для снятия отеков и липокалин, ассоциированный с нейтрофильной желатиназой (NGAL), в качестве маркера ремоделирования сердца. Могут потребоваться дополнительные параметры.

- Идентификация биомаркеров, которые могут (1) предсказать ответ на лечение с помощью CDR132L, (2) объяснить вариабельность PK/PD лекарственного средства, (3) предсказать восприимчивость к лекарственным взаимодействиям или (4) предсказать возникновение проблем с безопасностью. Целью такого поискового исследования будет улучшение понимания внутренних и внешних факторов, которые могут влиять на фармакокинетику CDR132L у людей. Это не будет включать какое-либо секвенирование генома (ДНК) пациентов.

Дизайн исследования

Это рандомизированное двойное слепое плацебоконтролируемое исследование фазы I для оценки безопасности, фармакокинетики и фармакодинамических параметров CDR132L у пациентов со стабильной сердечной недостаточностью ишемического происхождения (стадии I-III согласно NYHA).

В исследование будет включено максимум двадцать восемь пациентов. Ниже приведены четыре планируемых группы с максимальным размером групп. Каждая из этих групп будет включать до 7 пациентов. Пациенты будут рандомизированы на получение внутривенной 15-минутной инфузии CDR132L или плацебо в соотношении до 5:2.

- лечение 1 (n = до 7) - 0,32 мг/кг CDR132L; плацебо;
- лечение 2 (n = до 7) - 1,00 мг/кг CDR132L; плацебо;
- лечение 3 (n = до 7) - 3,00 мг/кг CDR132L; плацебо;
- лечение 4 (n = до 7) - 10,00 мг/кг CDR132L; плацебо.

Пациенты будут подвергнуты скринингу за 41 день до включения в исследование в день 1. До проведения любых скрининговых процедур каждый субъект получит устную и письменную информацию с последующим подписанием формы информированного согласия (ICF). Субъекты будут приняты в исследовательское отделение в день 1 и выписаны в день 4, повторно приняты в день 27 и выписаны в день 31. В день 1 добровольцы получают либо CDR132L, либо плацебо; они получают вторую соответствующую дозу после повторного поступления в день 27 путем введения второй дозы в день 28. Все пациенты должны получать стандарт лечения (Standard of Care, SoC) для сердечной недостаточности ишемического происхождения в соответствии с последними европейскими рекомендациями (14). CDR132L или плацебо будут назначаться в качестве дополнительной терапии к лечению SoC.

Все субъекты будут посещать отделение для запланированных амбулаторных посещений в дни 10-14, 56, 84 и 112. Все оценки, выполняемые в ходе исследования, подробно описаны в графике оценок исследования (таблица 2 и таблица 3). Особенности

дизайна исследования могут быть адаптированы в соответствии с адаптивными признаками (таблица 4). В этом исследовании будет использована стратегия сигнального дозирования, более подробную информацию см. в разделе 3.3.5.

#### Количество субъектов

5 Двадцать восемь пациентов со стабильной сердечной недостаточностью ишемического происхождения были отобраны для дозирования групп 1, 2, 3 и 4.

#### Основные критерии включения в исследование

C18036\_CDR132L-FIH01\_Протокол клинического исследования\_v1.0\_17Apr2019.

10 Шаблон протокола клинического исследования (версия 6) 14 марта 2019 г. стр. 16 из 85.

Будут включены субъекты в возрасте от 30 до 80 лет с индексом массы тела (BMI) от 18,0 до 28,0 кг/м<sup>2</sup> и подтвержденной стабильной сердечной недостаточностью ишемического происхождения.

15 Основными критериями исключения являются: сердечная недостаточность неишемического происхождения (гипертоническая болезнь сердца, миокардит, алкогольная кардиомиопатия и сердечная дисфункция из-за быстрой фибрилляции предсердий), текущее или рецидивирующее заболевание, за исключением стабильной сердечной недостаточности (например, гематологическое, неврологическое, эндокринное, иммунологическое, почечное, печеночное, желудочно-кишечное или  
20 другое состояние), которое может повлиять на действие, абсорбцию или фармакокинетику CDR132L, или может повлиять на клинические оценки или клинические лабораторные исследования.

#### Экспериментальное лечение и способ введения

25 Группа 1. Внутривенная инфузия 0,32 мг/кг CDR132L (15 мин; 20 мл) в дни 1 и 28 (n = 5).

Группа 2. Внутривенная инфузия 1,00 мг/кг CDR132L (15 мин; 20 мл) в дни 1 и 28 (n = 5).

Группа 3. Внутривенная инфузия 3,00 мг/кг CDR132L (15 мин; 20 мл) в дни 1 и 28 (n = 5).

30 Группа 4. Внутривенная инфузия 10,00 мг/кг CDR132L (15 мин; 20 мл) в дни 1 и 28 (n = 5).

#### Эталонное лечение и способ введения

Внутривенная инфузия (15 мин; 20 мл) плацебо (n = 8) для соответствия с CDR132L.

#### Критерии оценки

35 Анализ безопасности

Оценки безопасности будут включать стандартные лабораторные анализы на безопасность (гематология, коагуляция, биохимия и анализ мочи), показатели жизненно важных функций (систолическое артериальное давление [SBP], диастолическое артериальное давление [DBP], частота дыхания, частота пульса и тимпанальная  
40 температура), физическое обследование, ЭКГ в 12 отведениях (RR, PR, QRS, QT, интервалы QTcF и частота сердечных сокращений [HR]), телеметрию, оценку биомаркеров и мониторинг нежелательных явлений.

#### Фармакокинетический анализ

45 Следующие фармакокинетические параметры будут рассчитаны на основе измеренных концентраций CDR132L в плазме: максимально наблюдаемая концентрация в плазме (C<sub>max</sub>), время до достижения максимальной концентрации в плазме (t<sub>max</sub>), площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени от нуля до

последней поддающейся определению концентрации в плазме ( $AUC_{0-t}$ ), площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени от нулевого времени, экстраполированного на бесконечность ( $AUC_{0-inf}$ ), клиренс крови (CL), константа конечной скорости выведения ( $\lambda_z$ ), конечный период полувыведения ( $t_{1/2}$ ), объем распределения ( $V_{dss}$ ).

#### Фармакодинамический анализ

Фармакодинамические оценки будут носить исследовательский характер и будут оцениваться путем взятия образцов крови для определения концентрации следующих биомаркеров: микроРНК 132 (miR-132) для связывания с мишенью, пронатрийуретический N-концевой пептид b-типа (NT-pro-BNP) для устранения отеков и липокалин, ассоциированный с нейтрофильной желатиназой (NGAL), в качестве маркера ремоделирования сердца. Могут потребоваться дополнительные параметры.

#### Статистические методы

План статистического анализа (SAP), содержащий подробную статистическую методологию, будет записан и подписан перед закрытием базы данных. План может быть обновлен, чтобы отразить адаптивные особенности исследования по мере необходимости.

#### Статистический анализ параметров безопасности

Нежелательные явления (AE), показатели жизненно важных функций, параметры ECG и данные клинических лабораторных исследований будут перечислены и обобщены с использованием описательной статистики.

Количество (и процент) субъектов, у которых имелись какие-либо AE, будут обобщены для каждой дозы. Все AE будут перечислены по классу системного органа (SOC) и предпочтительному термину (PT), присвоенному событию, с использованием Медицинского словаря нормативной деятельности (MedDRA). Более того, эти события будут обобщены по максимальной интенсивности. Также будет обобщено количество субъектов, у которых были AE, связанные с лекарственным средством. Будут перечислены любые серьезные нежелательные явления (SAE) и/или нежелательные явления, которые привели к исключению из исследования.

#### - Статистический анализ фармакокинетических параметров

Концентрации в плазме будут перечислены и обобщены по временным точкам. Параметры PK будут перечислены для каждого субъекта и обобщены для каждой лечебной группы с использованием описательной статистики. Для предварительной оценки пропорциональности доз для  $C_{max}$  и AUC будут рассчитаны и описательно обобщены нормализованные по дозе  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-t}$  и  $AUC_{0-inf}$  в плазме. Кроме того, модель мощности с log (параметр PK) в качестве переменной отклика и log (доза) в качестве предиктора будет подгоняться к данным для  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-t}$  и  $AUC_{0-inf}$  в плазме. Наклон 1 в этой модели соответствует пропорциональности дозы. Наклон будет оцениваться с его двухсторонним 90% и 95% CI.

#### - Статистический анализ фармакодинамических параметров

Данные PD параметров будут перечислены и обобщены: абсолютные значения вместе с отклонениями от базового уровня, с использованием описательной статистики.

Для каждой группы дозирования отношения между концентрацией в плазме и параметрами PD будут исследованы с использованием графического представления каждого PD параметра в зависимости от концентраций в плазме. Эта взаимосвязь будет исследована с использованием пересечения PK и соответствующей популяции PD. Если сводная статистика и графические представления указывают на взаимосвязь между

концентрацией в плазме и PD параметром, может быть разработана соответствующая статистическая модель для дальнейшего объяснения этой взаимосвязи.

## 12.2 Характеристики пациента

28 пациентов со стабильной сердечной недостаточностью (HF) ишемического происхождения (NYHA 1-3) были включены в рандомизированное двойное слепое плацебоконтролируемое исследование. Характеристики пациентов дополнительно включали диабет 2 типа, перенесенный ранее инфаркт миокарда, фибрилляцию предсердий, артериальную гипертензию, чрескожное вмешательство и/или аортокоронарное шунтирование. Фракция выброса левого желудочка находилась в диапазоне от 31% до 56%.

Пациенты получали фоновое лечение сопутствующих заболеваний по усмотрению врача и получали стабильную терапию их индивидуального состояния HF. Большинство пациентов получали двойную/тройную терапию (бета-блокатор в сочетании с ингибитором АСЕ или блокатором рецепторов ангиотензина и антагонистом минералокортикоидных рецепторов). Два пациента из группы плацебо и 2 пациента из группы исследуемого препарата имели бивентрикулярный кардиостимулятор; 3 пациента из группы исследуемого препарата имели имплантированный кардиовертер-дефибриллятор (ICD).

## 12.3 Предварительные результаты

### Фармакокинетический (PK) профиль

PK-параметры CDR132L у человека подтвердили профиль безопасности без признаков накопления. Высокий уровень линейности дозы  $C_{max}$  и AUC позволил прогнозировать PK параметры для других доз (например, 5 мг/кг). На основании предварительных результатов исследования фазы Ib можно предположить, что начальная доза для фазы II клинического исследования составляет от 3 до 10 мг/кг с последующей поддерживающей дозой в диапазоне от 3 до 5 мг/кг.

### Связывание с мишенью

Уровни циркулирующей miR-132 у пациентов в группе исследуемого препарата были значительно и дозозависимо снижены и оставались низкими с течением времени (до конечной точки исследования на 112-й день).

### Результаты ECG

У большинства пациентов в группе исследуемого препарата при скрининге были выявлены отклонения от нормы ECG. Многие из них показали нормализацию или существенное дозозависимое улучшение (например, нормализация зубцов T; сужение QRS или отсутствие блокады левой ножки пучка Гиса (LBBB) и/или блокады правой ножки пучка Гиса (RBBB); нормализация прироста зубца R) при лечении с помощью CDR132L. Ни у кого не было ухудшения ECG по сравнению с исходным уровнем при лечении с помощью CDR132L. На основании данных QT и QTc не было обнаружено никаких намеков на проаритмический потенциал.

### Фармакодинамические (PD) параметры

Положительное влияние на фракцию выброса (EF) было обнаружено у большинства подвергнутых лечению пациентов. На NT-proBNP, как на маркер сердечной безопасности, лечение с помощью CDR132L не оказывало негативного влияния. Пациенты в группе самой высокой дозы (10 мг/кг) показали устойчивое снижение уровней NT-proBNP в день 28 и 122 по сравнению с исходным уровнем. Двукратное лечение с помощью CDR132L (доза 1-10 мг/кг) привело к улучшению EF и/или снижению значений NT-proBNP у >50% всех пациентов. Уменьшение времени изоволюмической релаксации (IVRT), важного маркера релаксации левого желудочка, было обнаружено

у пациентов с EF >45%, что указывает на пользу для пациентов с диастолической дисфункцией.

#### Биомаркеры

Биомаркеры сердечного фиброза С-концевой пропептид проколлагена I типа (PICP) и галектин-3 (Gal-3) показали пониженные уровни у пациентов с HF, получавших лечение с помощью CDR132L, что указывает на антифибротические эффекты. Кроме того, биомаркер фиброза матриксная металлопротеиназа 1 (MMP-1) положительно коррелировал с циркулирующими уровнями miR-132 и снижался у пациентов в группах, получавших более высокие дозы (группы 3 и 4). В конечной точке исследования уровни MMP-1 были ниже предела обнаружения в когорте 4.

#### Безопасность и переносимость

Серьезных нежелательных явлений (SAE) обнаружено не было. Не было выявлено патологических эффектов или сигналов безопасности по биохимическим и гематологическим параметрам, показателям жизненно важных функций и ECG.

#### 12.4 Заключение

CDR132L хорошо переносился пациентами с сердечной недостаточностью и не проявлял никаких признаков токсичности в дозах до 10 мг/кг.

Пример 13. Мониторинг терапии с помощью CDR132L путем количественной оценки циркулирующей miR-132-3p в плазме

Целью этого исследования являлась оценка уровней miR-132-3p в плазме в качестве биомаркера для мониторинга терапии с помощью CDR132L.

Уровень циркулирующей miR-132-3p измеряли в образцах плазмы плацебоконтролируемой модели сердечной недостаточности (HF), индуцированной инфарктом миокарда (MI) у свиней (фигура 21). Животные перенесли ИМ и были подвергнуты различным схемам лечения с помощью CDR132L, включая два его применения на 3-й день и месяц 1 (внутрикоронарное/внутривенное (ICIV) по сравнению с внутривенным/внутривенным (IVIV)) и три уровня доз CDR132L (низкий: 1 мг/кг, средний: 5 мг/кг или высокий: 10 мг/кг).

Исследование сопровождалось серийным взятием крови до 2-го месяца. В образцах плазмы крови, взятых в конечной точке, циркулирующие уровни miR-132-3p выявляли с помощью количественной ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) с использованием зондов TaqMan для miR-132-3p. Данные нормализовали к синтетической микроРНК (cel-miR-39), добавленной во время процедуры экстракции РНК.

Лечение с помощью CDR132L привело к дозозависимому увеличению содержания лекарственного вещества в органе-мишени, сердце, и значительному снижению функциональной miR-132-3p в образцах плазмы. На фиг. 22 показан корреляционный анализ концентрации CDR132L в сердечной ткани (отдаленная область MI LV) всех включенных животных (IVIV и ICIV) и циркулирующих уровней miR-132-3p, нормализованных к cel-miR-39. Данные представляют собой результаты для индивидуальных животных в виде средних значений  $\pm$  SEM. Значения P оценивали с помощью непараметрического двустороннего U-критерия Манна-Уитни (левая панель). Взаимосвязь выявляли при использовании коэффициента корреляции произведения моментов Пирсона и коэффициента ранговой корреляции Спирмена (правая панель). Соответственно, уровень циркулирующей miR-132-3p сильно коррелировал с концентрацией CDR132L в сердечной ткани подвергнутых лечению животных. Эти данные указывают на то, что уровень циркулирующей miR-132-3p является индикативным маркером присутствия CDR132L в сердечной ткани.

Авторы также оценивали, указывают ли другие установленные биомаркеры на

присутствие CDR132L в сердечной ткани. Пронатрийуретический N-концевой пептид b-типа (NT proBNP) хорошо известен как маркер сердечного стресса, который коррелирует с тяжестью сердечной недостаточности. В соответствии с уровнями miR-132-3p, на фигуре 23 показан корреляционный анализ концентрации CDR132L в ткани сердца (отдаленная область MI LV) всех включенных животных (IVIV и ICIV) и уровней NT-proBNP в плазме (пронатрийуретический N-концевой пептид b-типа). Данные представлены для индивидуальных животных в виде средних значений  $\pm$  SEM. Значения P оценивали с помощью непараметрического двустороннего U-критерия Манна-Уитни (левая панель). Взаимосвязь выявляли при использовании коэффициента корреляции произведения моментов Пирсона и коэффициента корреляции рангового порядка Спирмена (правая панель). Снижение NT-proBNP наблюдали в плазме животных, подвергнутых лечению CDR132L (фигура 23). Однако зависимость от дозы была менее очевидной, а корреляция с сердечным CDR132L менее значимой.

Помимо связи между циркулирующей miR-132 в плазме и CDR132L в сердце, авторы оценили, эффективно ли лекарственное средство ингибирует свою микроРНК-мишень miR-132-3p. Функциональные уровни miR-132-3p были значительно снижены в сердечной ткани (отдаленная область MI LV), и это снижение было тем сильнее, чем выше доза.

На фигуре 24 показан корреляционный анализ функциональных уровней miR-132-3p в сердечной ткани (отдаленная область LV MI) всех включенных животных (IVIV и ICIV) и циркулирующих уровней этой микроРНК, нормализованных к cel-miR-39. Данные представлены для отдельных животных в виде среднего значения  $\pm$  SEM. Значения P оценивали с помощью непараметрического двустороннего U-критерия Манна-Уитни (левая панель). Взаимосвязь выявляли при использовании коэффициента корреляции произведения моментов Пирсона и коэффициента ранговой корреляции Спирмена (правая панель). Корреляция плазменного и сердечного miR-132-3p не выявила значительной отрицательной связи между обоими параметрами, указывая на то, что уровни miR-132-3p в плазме свидетельствуют об активности CDR132L в отношении его мишени miR-132-3p.

Было показано, что лечение с помощью CDR132L улучшает сердечную функцию после ИМ. Соответственно, авторы проверили, соответствует ли это функциональное улучшение и изменение фракции выброса левого желудочка (EF), сравниваемые между днем 3 после ИМ и месяцем 2 (дельта EF), циркулирующей miR-132-3p. Значительная отрицательная корреляция наблюдалась для обоих параметров, указывая на то, что уровень циркулирующей miR-132-3p является показателем улучшения сердечной функции.

На фигуре 25 показан корреляционный анализ дельта EF (улучшение EF с дня 3 по месяц 2) всех включенных животных (IVIV и ICIV) и циркулирующие уровни этой микроРНК, нормализованные к cel-miR-39. Данные представлены для индивидуальных животных в виде средних значений  $\pm$  SEM. Значения P оценивали с помощью непараметрического двустороннего критерия U Манна-Уитни (левая панель). Взаимосвязь выявляли при использовании коэффициента корреляции произведения моментов Пирсона и коэффициента ранговой корреляции Спирмена (правая панель).

Отрицательная связь была столь же сильной, как и корреляция между функциональным улучшением и маркером сердечного стресса NT-proBNP.

На фигуре 26 показан корреляционный анализ уровней NT-proBNP в плазме всех включенных животных (IVIV и ICIV) и дельта EF (улучшение EF с дня 3 по месяц 2). Данные представлены для индивидуальных животных в виде средних значений  $\pm$  SEM. Значения P оценивали с помощью непараметрического двустороннего U-критерия

Манна-Уитни (левая панель). Взаимосвязь выявляли при использовании коэффициента корреляции произведения моментов Пирсона и коэффициента ранговой корреляции Спирмена (правая панель).

Кроме того, низкий уровень циркулирующего NT-proBNP линейно соответствует  
5 низкому уровню циркулирующей miR-132-3p.

На фигуре 27 показан корреляционный анализ уровней NT-proBNP в плазме всех включенных животных (IVIV и ICIV) и циркулирующих уровней miR-132-3p, нормализованных к cel-miR-39. Данные представлены для индивидуальных животных в виде средних значений  $\pm$  SEM. Значения P оценивали с помощью непараметрического  
10 двустороннего U-критерия Манна-Уитни (левая панель). Взаимосвязь выявляли при использовании коэффициента корреляции произведения моментов Пирсона и коэффициента ранговой корреляции Спирмена (правая панель).

Пример 14. CDR132L при подострой сердечной недостаточности

14.1 Цель исследования. Тестирование эффективности CDR132L на модели подострой  
15 сердечной недостаточности (HF) после инфаркта миокарда на свиньях.

14.2 План исследования

- модель HF после инфаркта миокарда с 56-дневным периодом последующего наблюдения у 135 животных;
- домашние свиньи с медленным набором веса (порода «Мангалица»);
- плацебо-контроль и 3 дозовые группы;  
20 1, 5, 10 мг/кг м.т., лечили дважды, на 3 и 28 дни (фигура 28);
- сравнение внутрикоронарного/внутривенного (IC/IV) и внутривенного/внутривенного (IV/IV) введений;
- животные, рассматриваемые для анализа данных: 79 животных.

25 14.3 Результаты

Изменение фракции выброса Delta EF (EF день 56 - EF день 3).

Примечание. Критерии включения, EF на 3-й день <40%

Значительные изменения EF с 3-го по 56-й день (дельта-EF) после инфаркта миокарда  
30 были обнаружены в группах, получавших средние и высокие дозы IV/IV и IC/IV, что указывает на функциональное улучшение (фигура 29).

Корреляция циркулирующих NT-proBNP и дельта EF (день 56 - день 3).

Связанное с HF после инфаркта миокарда повышение NT-proBNP было обращено  
вспять в группах со средней и высокой дозой на 56-й день. Низкий уровень концентрации циркулирующего NT-proBNP соответствует улучшению сердечной функции, о чем  
35 свидетельствует увеличение дельта-EF. NT-proBNP служит потенциальным биомаркером связывания с мишенью (см. Пример 13).

Фиброз (в %) в конечной точке (56-й день) в отдаленной области LV MI.

Примечание. Критерии включения, EF на 3-й день <40%

Значительные изменения в развитии фиброза были обнаружены в группе, получавшей  
40 среднюю и высокую дозы, способствуя функциональному улучшению (фигура 30).

Терапевтический ответ (56 день).

Примечание. Критерии включения, EF на 3-й день <40%

Анализ респондентов выявил дозозависимый ответ в улучшении EF. 85,7% животных  
45 группы, получавшей высокую дозу IVIV, показали дельта EF >7%, тогда как только 4,6% всех животных, получавших плацебо, показали восстановление >7% (фигура 31).

14.4 Выводы

CDR132L эффективно улучшает сердечную функцию, что основано на результатах МРТ сердца, признанного метода «золотого стандарта», в клинически значимой и

установленной модели сердечной недостаточности после перенесенного инфаркта миокарда на крупных животных. Наблюдалась линейная дозовая зависимость для улучшения сердечной функции. Группа, получавшая высокую дозу IVIV, показала увеличение EF на 56-й день на 10,38% по сравнению с 3-м днем (с поправкой на плацебо).

5 Продемонстрированная эффективность CDR132L имеет большое клиническое значение (для сравнения, трансплантация сердечных клеток увеличивает EF в лучшем случае на 3-4%).

Пример 15. CDR132L для лечения хронической сердечной недостаточности

10 15.1 Цель исследования. Тестирование эффективности CDR132L на модели хронической сердечной недостаточности (HF) после ИМ у свиней

15.2 План исследования

Подтверждение эффективности CDR132L на модели хронической сердечной недостаточности (HF) после ИМ у свиней.

15 • Хроническая модель HF после ИМ с периодом последующего наблюдения 6 месяцев (фигура 32);

• Домашние свиньи с медленным набором веса (порода «Мангалица»);

• Три лечебных группы:

5 раз в месяц плацебо;

5 раз в месяц CDR132L;

20 3 раза в месяц CDR132L.

• Доза: 5 мг/кг

• Способ введения: IV

• Животные, рассматриваемые для анализа данных: 29 животных.

15.3. Результаты

25 Фракция выброса (EF)

Примечание. Критерии включения, EF в 1-й месяц <40%.

Значительные изменения EF, составляющие >7%, в период с 1 по 6 месяц после ИМ были обнаружены во всех лечебных группах по сравнению с плацебо (фигура 33).

Анализ данных пациентов, ответивших на лечение

30 Примечание. Критерии включения, EF в 1-й месяц <40%.

Наблюдалась сильная корреляция между количеством введений и улучшением EF (дельта EF M6-M1) (фигура 33). 87,5% группы, получавшей 5-кратное лечение, показали дельта EF >7%, тогда как только 2 из 11 животных, получавших плацебо, показали восстановление >3%.

35 Уровни CDR132L и miR-132-3p через 6 месяцев

Примечание. Критерии включения, EF в 1-й месяц <40%.

Наблюдалось дозозависимое распределение CDR132L в сердечной ткани (отдаленная область LV ИМ). Концентрация CDR132L в ткани соответствует низкому функциональному уровню miR-132-3p (фигура 34).

40 Конечный систолический объем левого желудочка (LVESV)

Лечение с помощью CDR132L показало положительный эффект на неблагоприятное ремоделирование левого желудочка и значительно ослабило увеличение LVESV после ИМ через 6 месяцев периода последующего наблюдения в обеих лечебных группах по сравнению с плацебо.

45 Левое предсердие (LA)

Хроническое ремоделирование предсердий после ИМ было уменьшено путем лечения с помощью CDR132L по данным оценки путем визуализации. Объем LA и индекс LA (объем LA, нормализованный к площади поверхности тела) были значительно снижены

в обеих лечебных группах по сравнению с плацебо.

#### Систолическая функция и сократимость

Систолическая функция и сократимость были значительно улучшены путем лечения с помощью CDR132L после перенесенного ИМ, что оценивалось с помощью инвазивного гемодинамического измерения в конечной точке через 6 месяцев. Анализ не зависящих от нагрузки параметров выявил зависимое от лечения с помощью CDR132L улучшение сократимости миокарда (соотношение конечного систолического давления и объема (ESPVR - end-systolic pressure-volume relationship), и ударная работа в ответ на преднагрузку (PRSW - preload recruitable stroke work)), что явно отражалось на улучшении общей систолической функции.

#### Диастолическая функция

Лечение с помощью CDR132L значительно улучшало диастолическую функцию. Глобальный диастолический параметр (минимальная скорость изменения давления в желудочке) и независимый от нагрузки параметр EDPVR (end-diastolic pressure volume relationship, соотношение конечного диастолического давления и объема), чувствительный маркер жесткости и емкости сердца, были улучшены путем лечения с помощью CDR321L.

#### 15.4 Выводы

CDR132L значительно улучшает сердечную функцию, как показано на модели хронической сердечной недостаточности у свиней. Увеличение EF на 7,14% было продемонстрировано на 6-м месяце у животных, получавших пять ежемесячных введений CDR132L (с поправкой на плацебо). 87,5% животных отвечали на лечение улучшением EF более чем на 7%. Никаких побочных эффектов, связанных с терапией, или изменений в гематологии или лабораторной биохимии не наблюдалось. Продемонстрированная эффективность CDR132L является высоко клинически значимой в качестве варианта лечения хронической сердечной недостаточности.

Кроме того, лечение с помощью CDR132L, проводимое ежемесячно, эффективно улучшает ремоделирование, а также систолическую функцию (например, сократительную способность сердца) и диастолическую функцию (например, расслабление сердца), как показано на модели хронической сердечной недостаточности после инфаркта миокарда.

#### Пример 16. Фармакокинетическое исследование

Для дополнительной оценки терапевтического потенциала CDR132L, авторы разработали фармакокинетическое исследование (ПК) на крупных животных, чтобы оценить воздействие на ткани и распределение в целевой ткани тестируемого соединения у свиней. Внутривенное (IV) введение является клинически предпочтительным способом введения, однако многие новые терапевтические подходы основаны на альтернативных путях введения, таких как интракоронарная (IC) перфузия, которая часто имеет место в исследованиях генной терапии сердечно-сосудистых заболеваний. Авторы обнаружили дозозависимое воздействие на ткани в образцах сердечной мышцы, сопоставимое с IV и IC введением CDR132L (фиг. 36 a, b). Активность CDR132L подтверждали по реципрокному дозозависимому снижению уровня целевой miR-132 по сравнению с не подвергнутыми лечению контрольными животными. Наблюдалась сильная обратная корреляция между концентрацией анти-miR-132 в сердце и функциональными уровнями miR-132 (фиг. 36 c) независимо от пути введения. Расчетный период полужизни соединения в сердечной ткани составил приблизительно 3 недели (фиг. 36 d) и для плазмы было обнаружено двухфазное выведение соединения с быстрой альфа-фазой и длинной бета-фазой (фиг. 36 e).

## (57) Формула изобретения

1. Применение олигонуклеотида, содержащего последовательность формулы III:  
 $5'-dA^*+T*dG^*+G*dC^*+T*dG^*+T*dA^*+G*dA^*dC^*dT*dG^*+T^*+T-3'$ ,

5 где dA представляет собой 2'-дезоксаденозин, dG представляет собой 2'-дезоксигуанозин, dC представляет собой 2'-дезоксцитидин и T представляет собой тимидин,

причем +T представляет собой строительный блок LNA-T, и +G представляет собой строительный блок LNA-G, и где \* представляет собой фосфоротиоатную связь,

10 в профилактике или лечении сердечного нарушения у человека, при этом сердечное нарушение выбрано из (i) острой или подострой сердечной недостаточности, (ii) хронической и/или ухудшающейся хронической сердечной недостаточности, (iii) стабильной сердечной недостаточности, (iv) менее прогрессирующего состояния сердечной недостаточности или прогрессирующего состояния сердечной  
 15 недостаточности, (v) сердечной недостаточности I и/или II стадии по NYHA, I, II и/или III стадии по NYHA или III и/или IV стадии по NYHA, и (vi) левосторонней или правосторонней сердечной недостаточности.

2. Применение по п. 1, отличающееся тем, что человек страдает сердечной недостаточностью и имеет имплантированный насос, необязательно вспомогательное  
 20 устройство для левого желудочка (LVAD).

3. Применение по п. 1 или 2, где олигонуклеотид вводят как таковой или где олигонуклеотид вводят конъюгированным с гетерологичным фрагментом.

4. Применение по любому из пп. 1-3, где олигонуклеотид вводят в комбинации с (i) по меньшей мере одним диуретиком, (ii) по меньшей мере одним ингибитором  
 25 ангиотензинпревращающего фермента, (iii) по меньшей мере одним  $\beta$ -блокатором и необязательно (iv) блокатором рецептора ангиотензина II, и (v) необязательно ингибитором If-каналов, таким как ивабрадин, и необязательно (vi) ингибитором ангиотензиновых рецепторов и неприлизина, и необязательно (vii) ингибитором натрийглюкозного котранспортера 2-го типа, таким как эмпаглифлозин и  
 30 дапаглифлозин, и необязательно (viii) терапевтическими средствами на основе стволовых клеток, и необязательно (ix) анти-miRNA, нацеленными на различные пути, и/или необязательно (x) ингибитором SGLT-2.

5. Применение по любому из пп. 1-4, где стабильная сердечная недостаточность имеет неишемическое или ишемическое происхождение.

35 6. Применение по любому из пп. 1-4, где левосторонняя сердечная недостаточность выбрана из систолической сердечной недостаточности или диастолической сердечной недостаточности, или состоянием, ассоциированным с систолической сердечной недостаточностью и/или диастолической сердечной недостаточностью.

7. Применение по любому из пп. 1-4, где сердечное нарушение представляет собой  
 40 заболевание, связанное с гипертрофией сердца.

8. Применение олигонуклеотида, содержащего последовательность формулы III:  
 $5'-dA^*+T*dG^*+G*dC^*+T*dG^*+T*dA^*+G*dA^*dC^*dT*dG^*+T^*+T-3'$ ,

45 где dA представляет собой 2'-дезоксаденозин, dG представляет собой 2'-дезоксигуанозин, dC представляет собой 2'-дезоксцитидин и T представляет собой тимидин,

где +T представляет собой строительный блок LNA-T, и +G представляет собой строительный блок LNA-G, и где \* представляет собой тиофосфатную связь,  
 в профилактике или лечении фиброзного нарушения.

9. Применение по п. 8, где фиброзное нарушение представляет собой фиброз сердца, фиброз печени или фиброз легких.

10. Применение по любому из пп. 1-9, где олигонуклеотид вводят человеку в дозе около 0,1-100 мг/кг массы тела на применение, в частности, в количестве около 3-10 мг/кг массы тела на применение.

11. Применение по любому из пп. 1-10, где олигонуклеотид вводят парентерально, например, путем инъекции или инфузии, необязательно путем внутривенной или подкожной инъекции, или где олигонуклеотид применяют местно.

12. Применение по любому из пп. 1-11, где олигонуклеотид вводят человеку по схеме, выбранной из:

- ежедневного введения,
- введения каждый второй день,
- введения каждый третий день и
- введения каждый четвертый день,

где олигонуклеотид вводят парентерально, в частности путем внутривенной или подкожной инъекции.

13. Применение по п. 12, где олигонуклеотид вводят в дозе, зависящей от массы тела.

14. Применение по п. 12, где олигонуклеотид вводят в дозе от 0,01 мг/кг массы тела до 50 мг/кг массы тела, в дозе от 0,02 мг/кг массы тела до 10 мг/кг массы тела или в дозе от 0,05 мг/кг массы тела до 5 мг/кг массы тела на применение.

15. Применение по п. 12, где олигонуклеотид вводят в фиксированной дозе.

16. Применение по п. 15, где фиксированная доза составляет от 1 мг до 5000 мг, от 2 мг до 1000 мг или от 5 мг до 500 мг на применение.

17. Применение по любому из пп. 1-11, где олигонуклеотид вводят человеку по схеме, выбранной из:

- еженедельного введения,
- введения каждую вторую неделю,
- введения каждую третью неделю,
- введения каждую четвертую неделю или каждый месяц,
- введения каждую шестую неделю,
- введения каждый второй месяц,
- введения каждый третий месяц,
- введения каждый шестой месяц и
- введения один раз в год,

где олигонуклеотид вводят парентерально, в частности путем внутривенной или подкожной инъекции.

18. Применение по п. 17, где олигонуклеотид вводят в дозе, зависящей от массы тела.

19. Применение по п. 18, где олигонуклеотид вводят в дозе от 0,01 мг/кг массы тела до 50 мг/кг массы тела, в дозе от 0,05 мг/кг массы тела до 20 мг/кг массы тела, в дозе от 0,1 мг/кг массы тела до 10 мг/кг массы тела или в дозе от 3 мг/кг массы тела до 10 мг/кг массы тела на применение.

20. Применение по п. 15, где олигонуклеотид вводят в фиксированной дозе от 1 мг до 5000 мг, в фиксированной дозе от 5 мг до 2000 мг или в фиксированной дозе от 10 мг до 1000 мг на применение.

21. Применение по любому из пп. 1-20, где олигонуклеотид вводят в начальной дозе, не обязательно в одной или двух начальных дозах, и затем по меньшей мере в одной поддерживающей дозе, которая отличается от начальной дозы.

22. Применение по любому из пп. 1-21, где олигонуклеотид вводят в режиме по

требованию, в частности, включающем стадии:

(i) измерение количества miR132 в образце биологической жидкости, необязательно в цельной крови, образце сыворотки или плазмы, или моче субъекта, подвергаемого лечению олигонуклеотидом,

5 (ii) введение олигонуклеотида в дозе и/или с временным интервалом между отдельными дозами, определенными в соответствии с измеренным количеством miR132 на стадии (i), в частности, где новую дозу олигонуклеотида вводят, если количество miR132 в образце биологической жидкости превышает заданное значение.

10 23. Применение по любому из пп. 1-22, включающее определение количества и/или активности маркера, в частности сердечного и/или фиброзного маркера, до, во время и/или после введения олигонуклеотида.

24. Применение по п. 23, где маркер выбран из BNP, необязательно NT-proBNP, ANP, изоформ тяжелых цепей миозина, необязательно отношения MYH7/6, FoxO3 SERCA2, отложения коллагена и/или маркера фиброза, такого как коллаген 1A1, коллаген 1A2, 15 коллаген 3A1, С-концевой пропептид проколлагена I типа (PICP), и/или галектина-3 (Gal-3), и/или матриксной металлопротеиназы, такой как матриксная металлопротеиназа 1 (MMP-1) и/или матриксная металлопротеиназа 2 (MMP-2).

25. Применение по п. 24, где маркер выбран из NT-proBNP, С-концевого пропептида проколлагена I типа (PICP) и/или галектина-3 (Gal-3), и/или матриксной 20 металлопротеиназы 1 (MMP-1).

26. Применение по любому из пп. 1-25, включающее определение параметра ECG во время курса терапии, в частности, выбранного из измерения QRS, зубцов Т, блокады левой ножки пучка Гиса (LBBB) и/или блокады правой ножки пучка Гиса (RBBB), и/или прироста зубца R, до, во время и/или после введения олигонуклеотида.

25 27. Способ мониторинга терапии олигонуклеотидом, являющимся объектом применения по любому из пп. 1-26, включающий определение количества и/или активности miR-132 в образце, полученном от субъекта, которому вводили олигонуклеотид, при этом определение проводят один или несколько раз в течение курса терапии.

30 28. Способ по п. 27, в котором количественно определяют miR-132 в образце циркулирующей биологической жидкости, например, в образце, выбранном из крови, плазмы, сыворотки или их фракций.

29. Способ по любому из пп. 27, 28, в котором на основании результата определения выполняют по меньшей мере одну из следующих процедур:

35 (i) определение, отвечает ли субъект, подвергаемый лечению, на терапию, (ii) корректировку дозы олигонуклеотида, подлежащего введению, и (iii) корректировку временного интервала между дозами олигонуклеотида, подлежащего введению.

30. Применение набора, содержащего:

- 40 • праймер, связывающийся с ДНК, кодирующей miR-132, или с ДНК, которая комплементарна указанной,  
 • праймер, связывающийся с ДНК, кодирующей miR-39, или с ДНК, которая комплементарна указанной,  
 • необязательно положительный контроль hsa-miR-132, и  
 45 • необязательно положительный контроль miR-39,  
 в способе мониторинга терапии по любому из пп. 27-29.

31. Применение по п. 30, где праймер, связывающийся с ДНК, кодирующей miR-132, или с ДНК, которая комплементарна указанной, представляет собой праймер hsa-miR-

132, а праймер, связывающийся с ДНК, кодирующей miR-39, или с ДНК, которая комплементарна указанной, представляет собой праймер sel-miR 39.

5

10

15

20

25

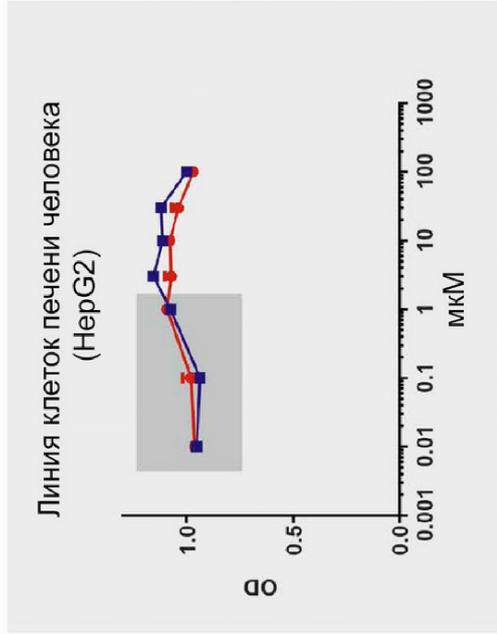
30

35

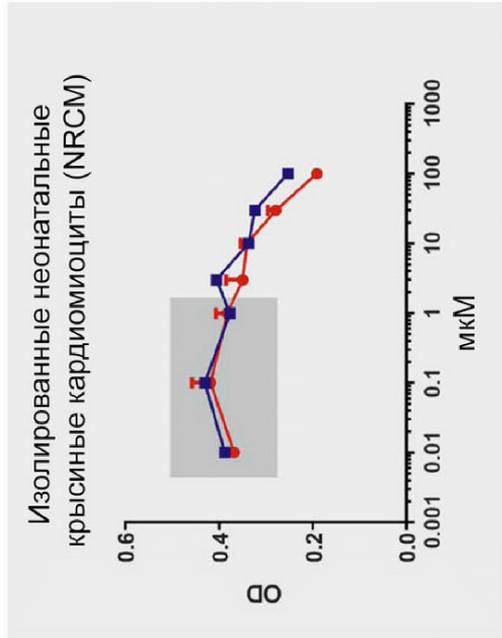
40

45

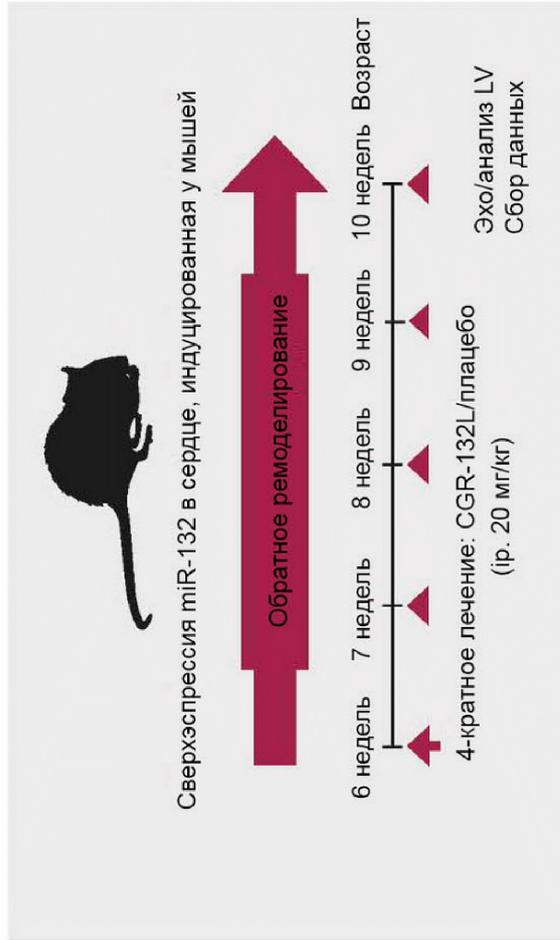
1/33



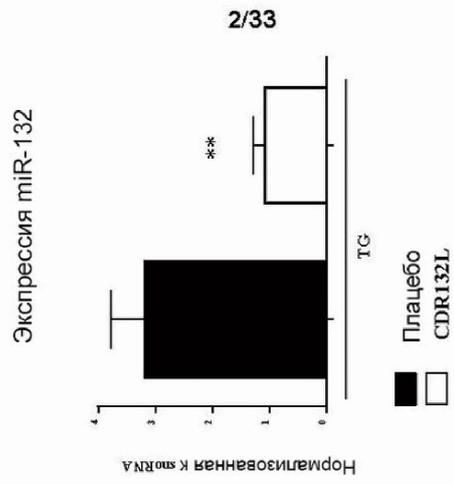
Фиг. 1B



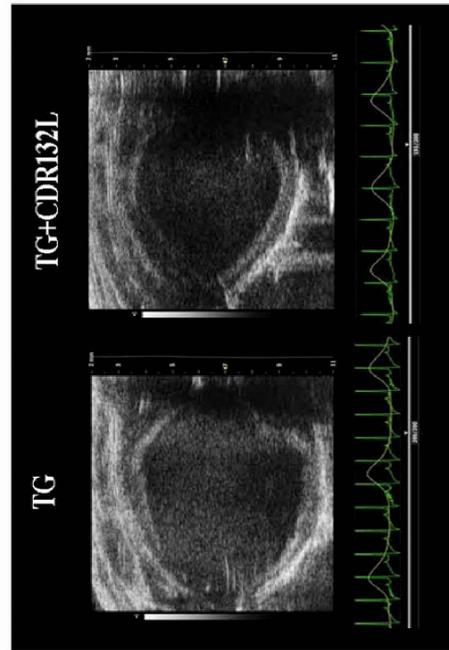
Фиг. 1A



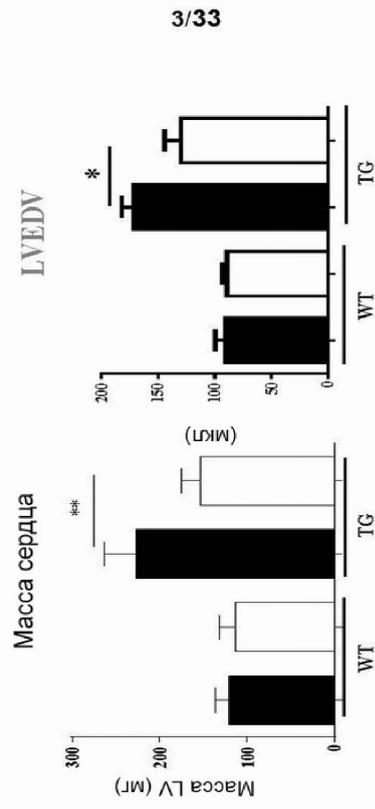
Фиг. 2А



Фиг. 2В



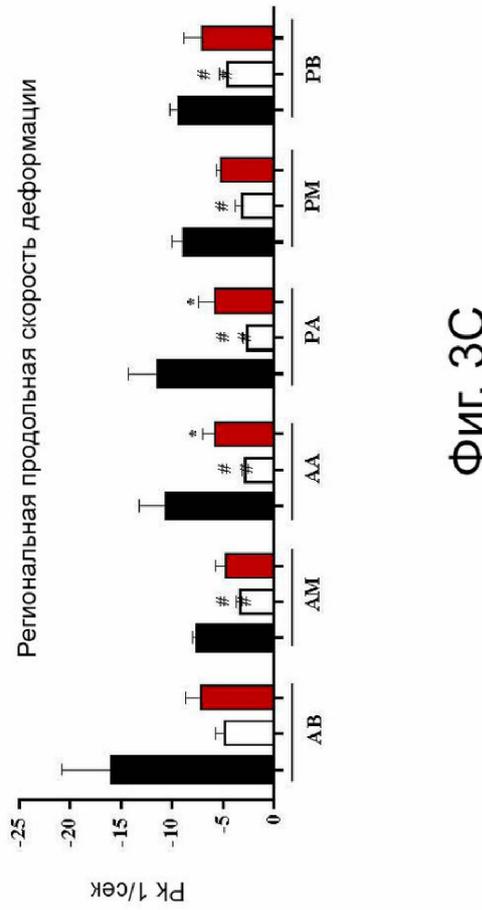
ФИГ. 3А



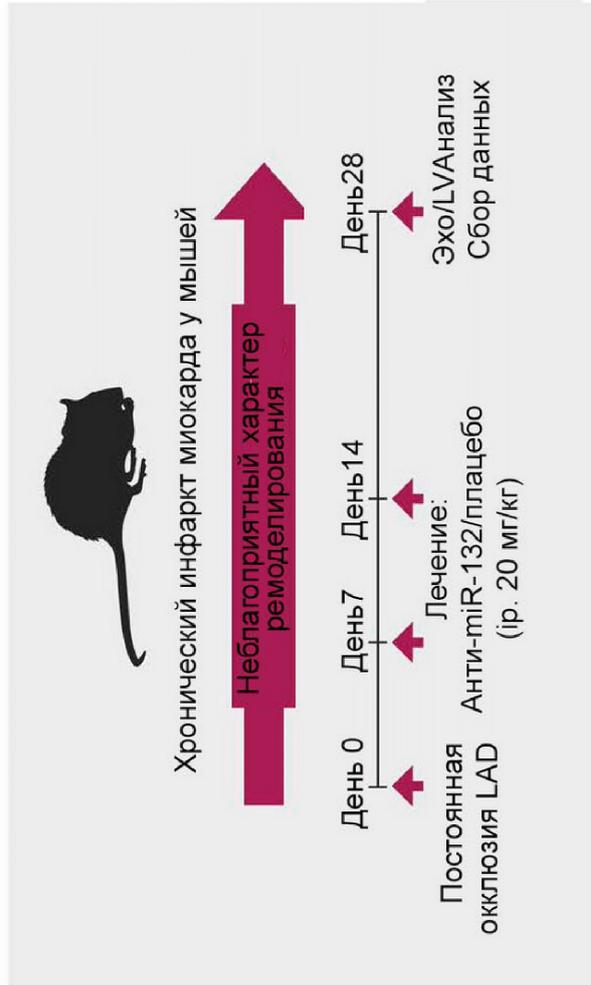
ФИГ. 3В

4/33

■ Плацебо  
□ CDR132L

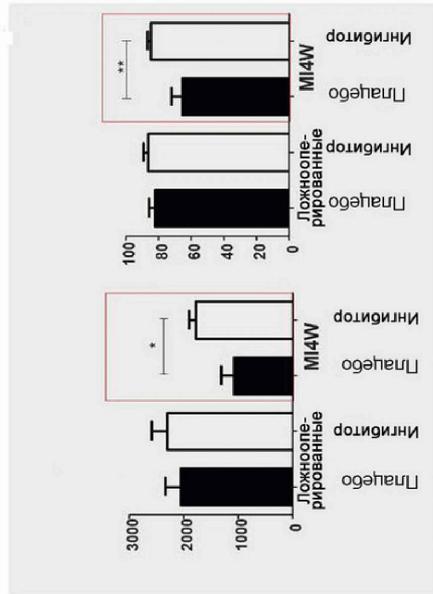


ФИГ. 3С

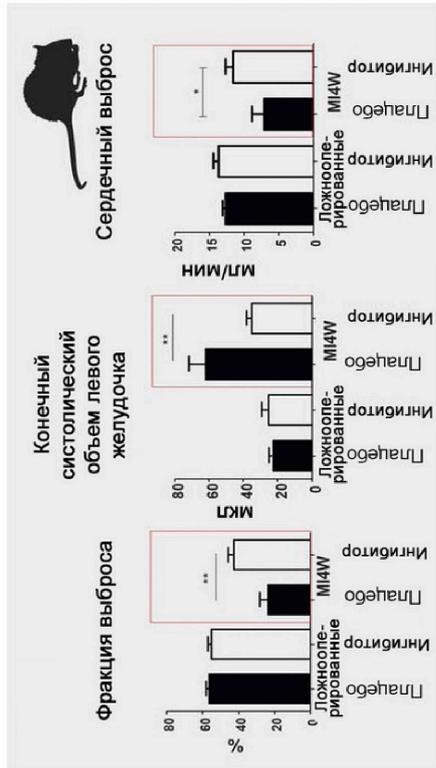


ФИГ. 4

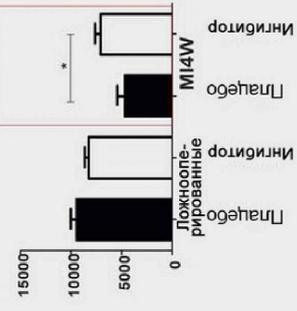
ФИГ. 5В

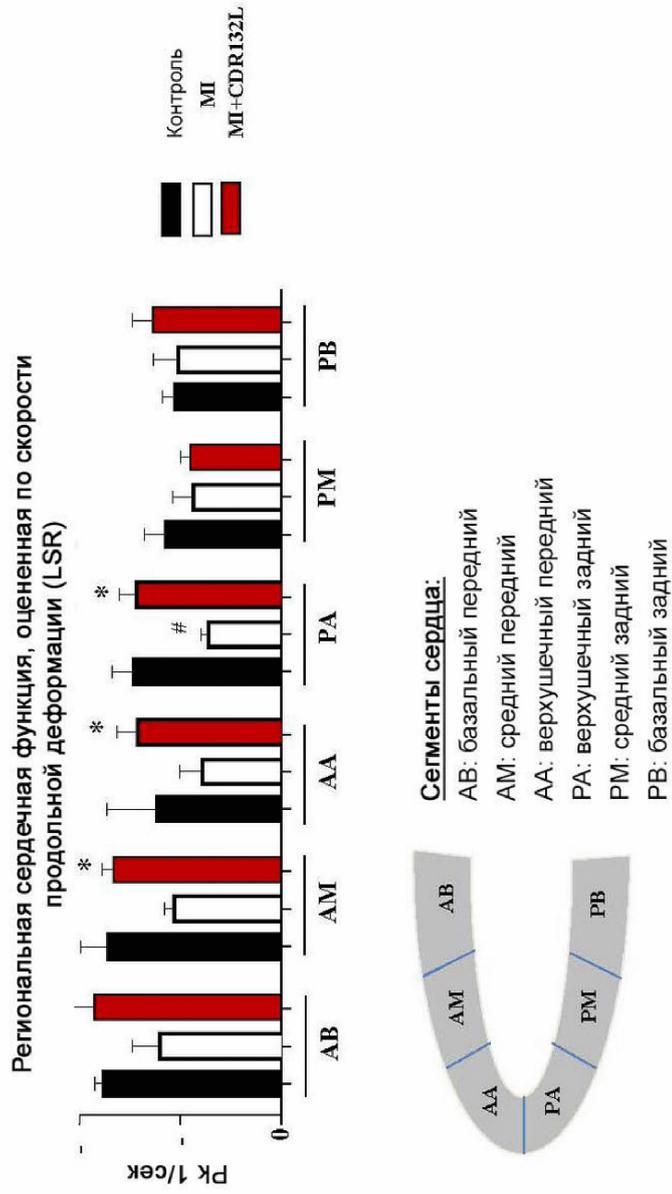


ФИГ. 5А

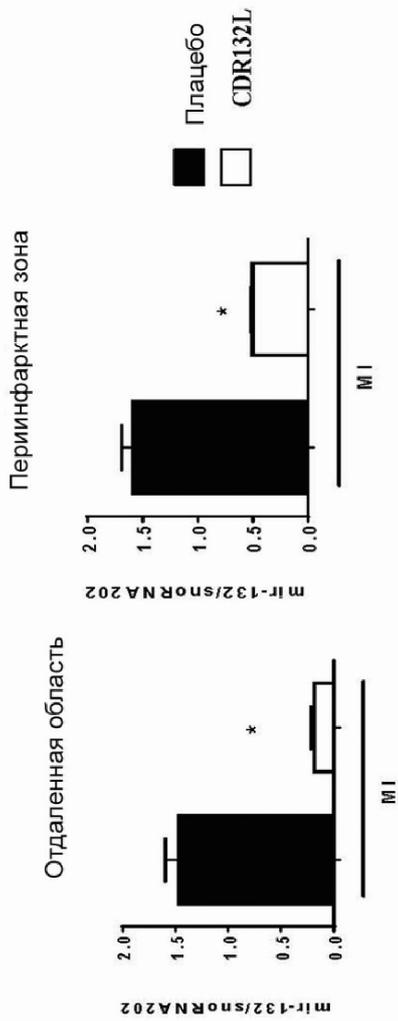


Максимальное развившееся Давление в левом желудочке

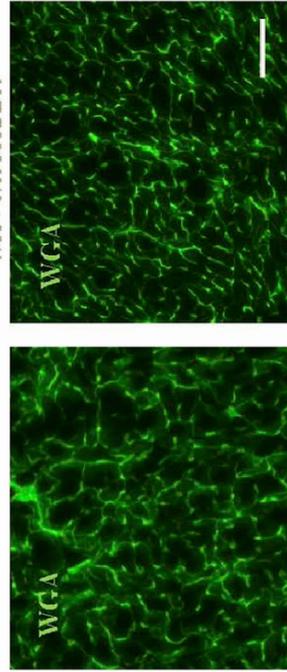




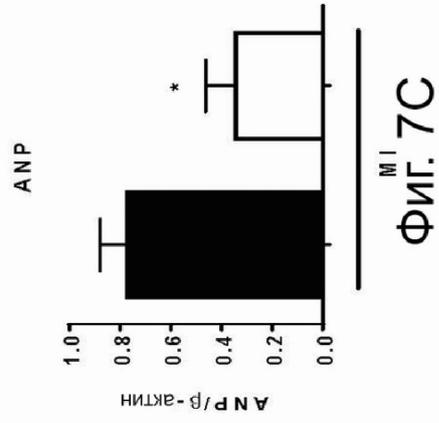
ФИГ. 6



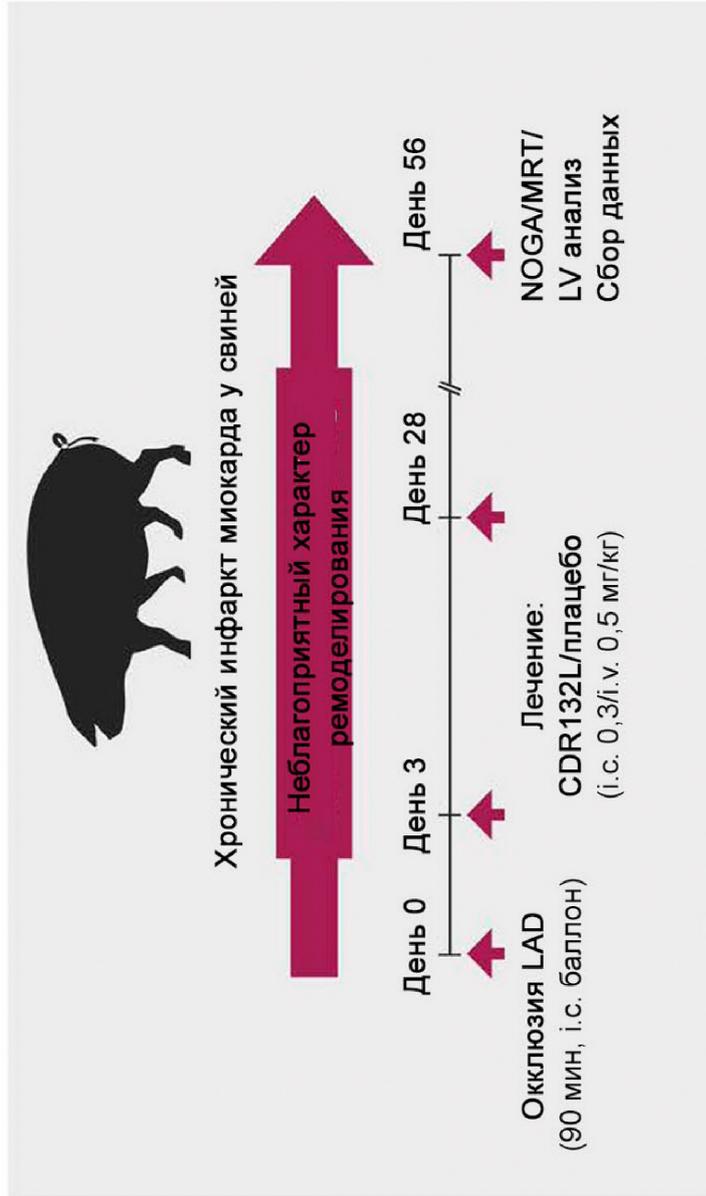
ФИГ. 7А



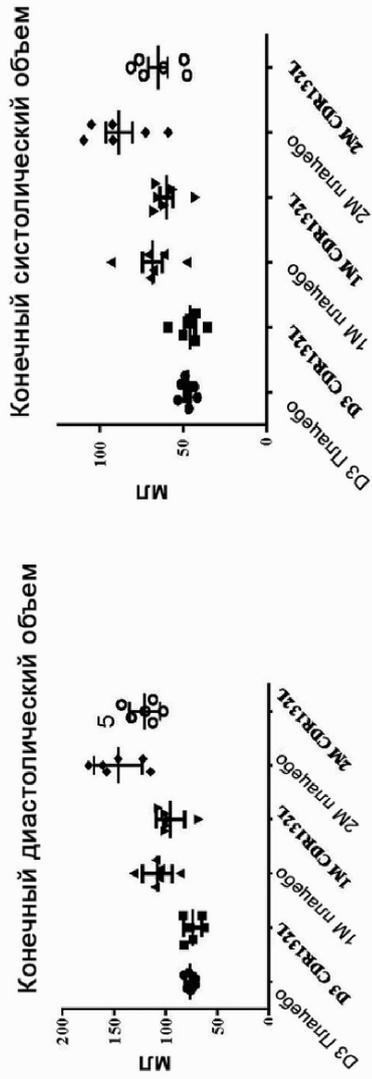
ФИГ. 7В



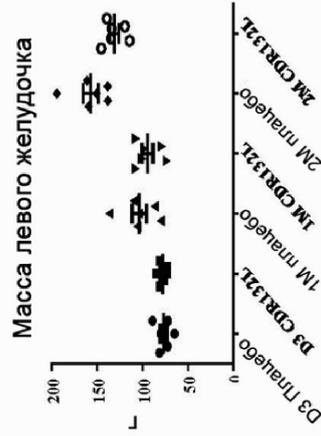
ФИГ. 7С



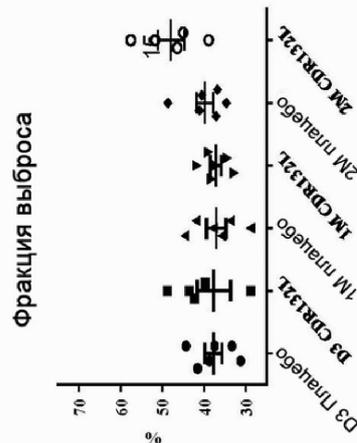
ФИГ. 8



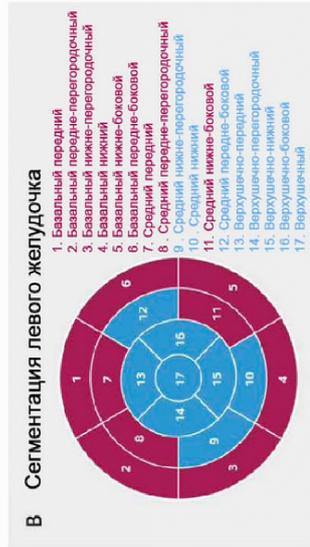
ФИГ. 9В



ФИГ. 9Е

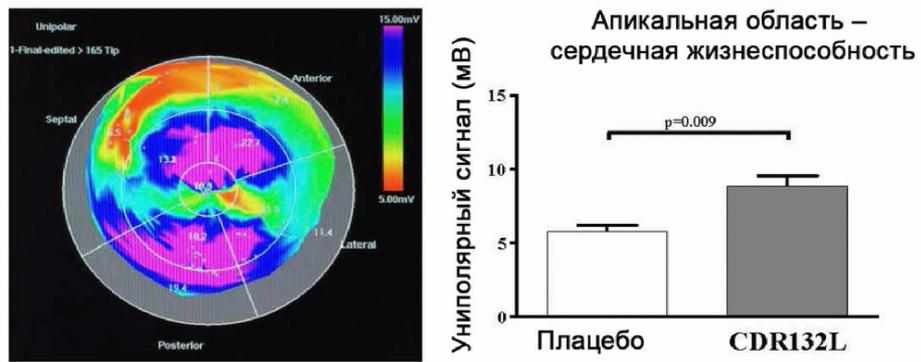


ФИГ. 9С



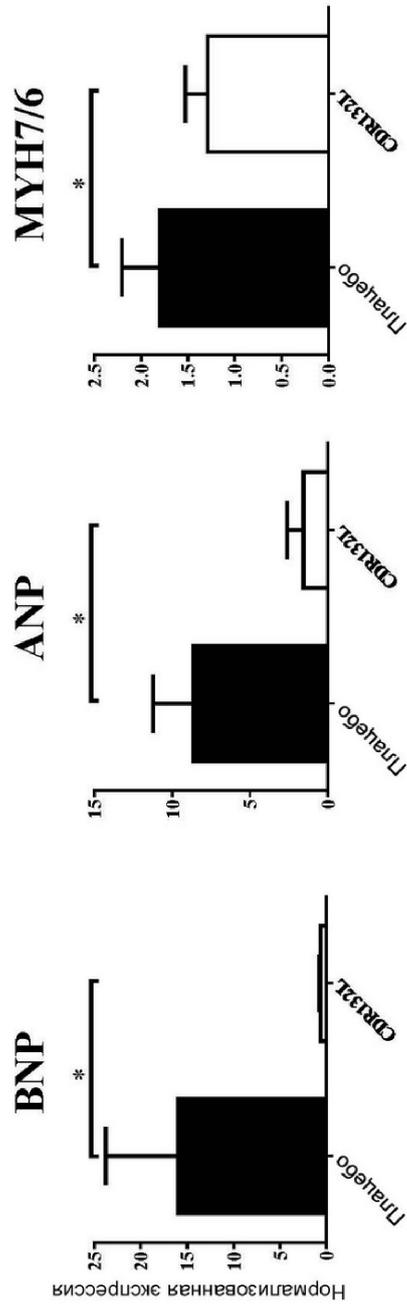
ФИГ. 9D

11/33

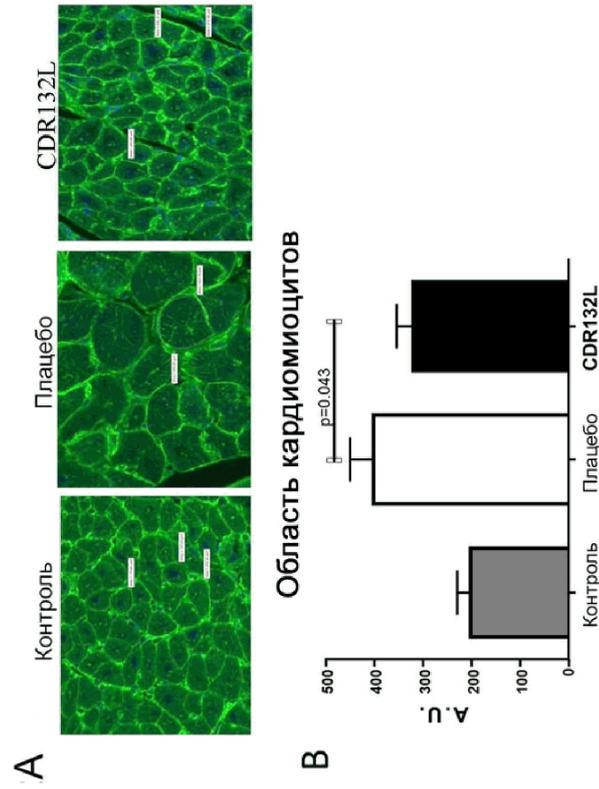


Фиг. 10

12/33

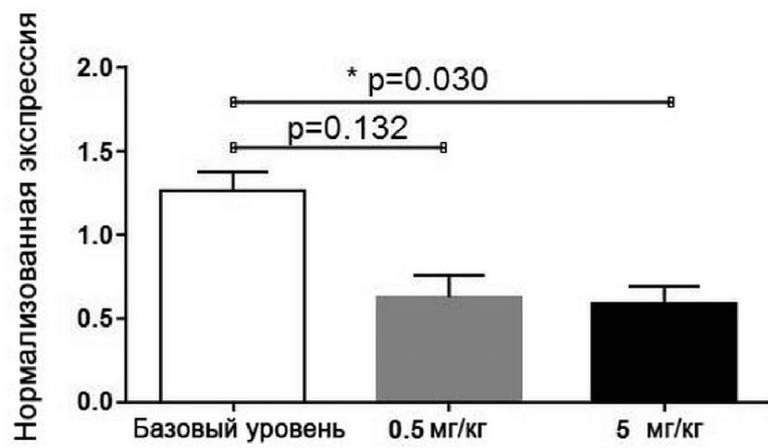


ФИГ. 11

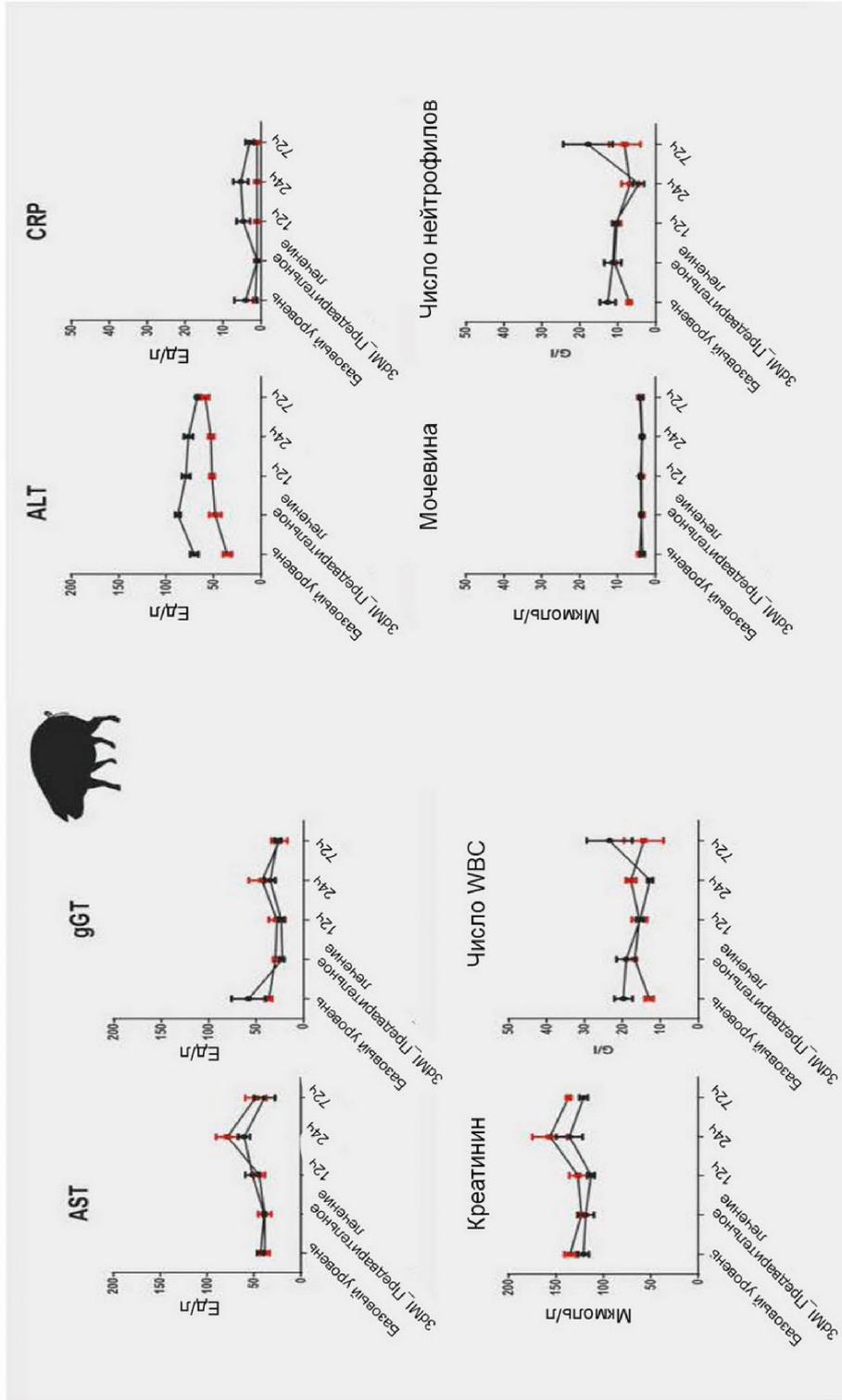


ФИГ. 12

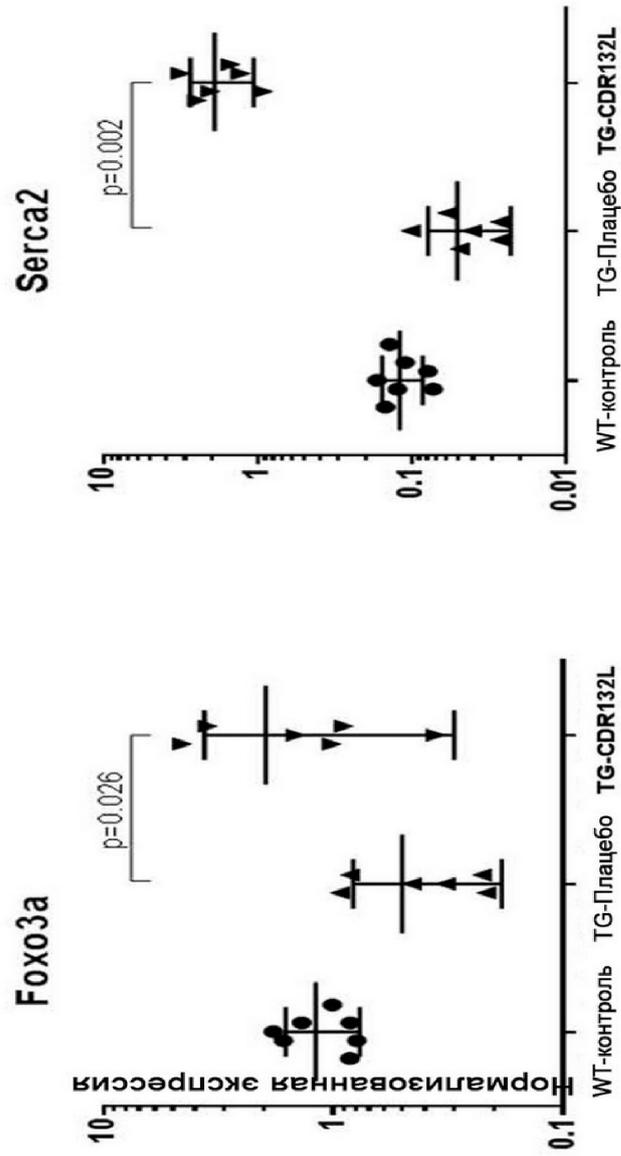
14/33



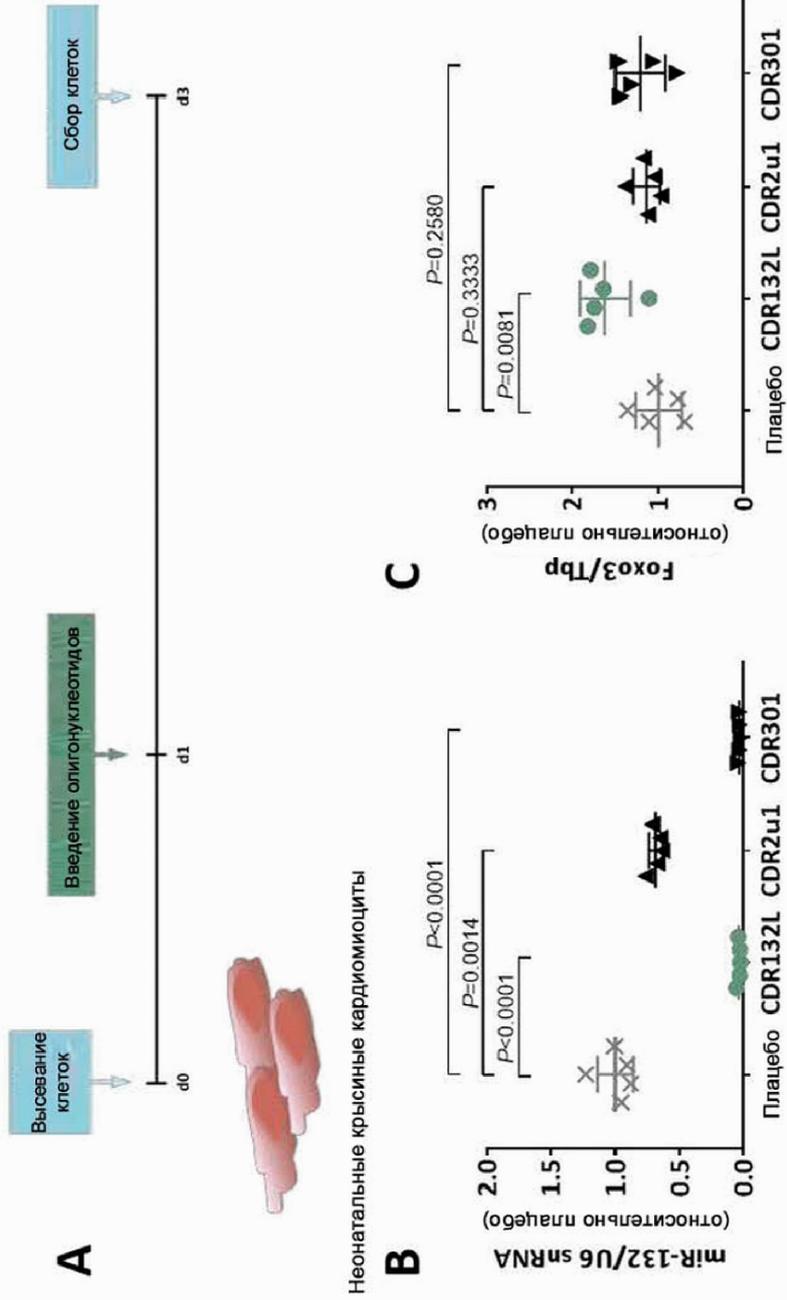
Фиг. 13



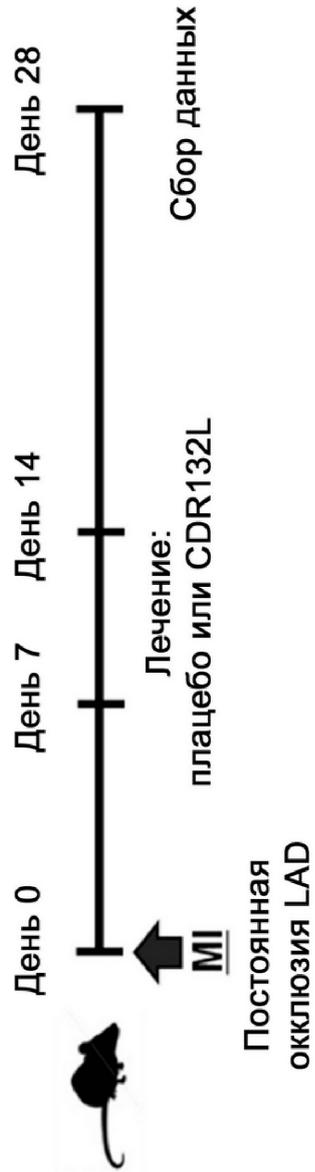
ФИГ. 14



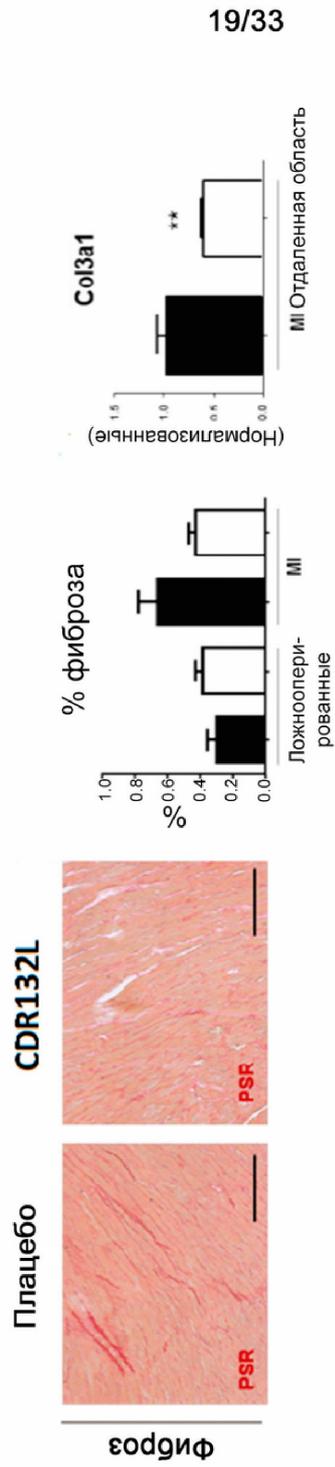
ФИГ. 15



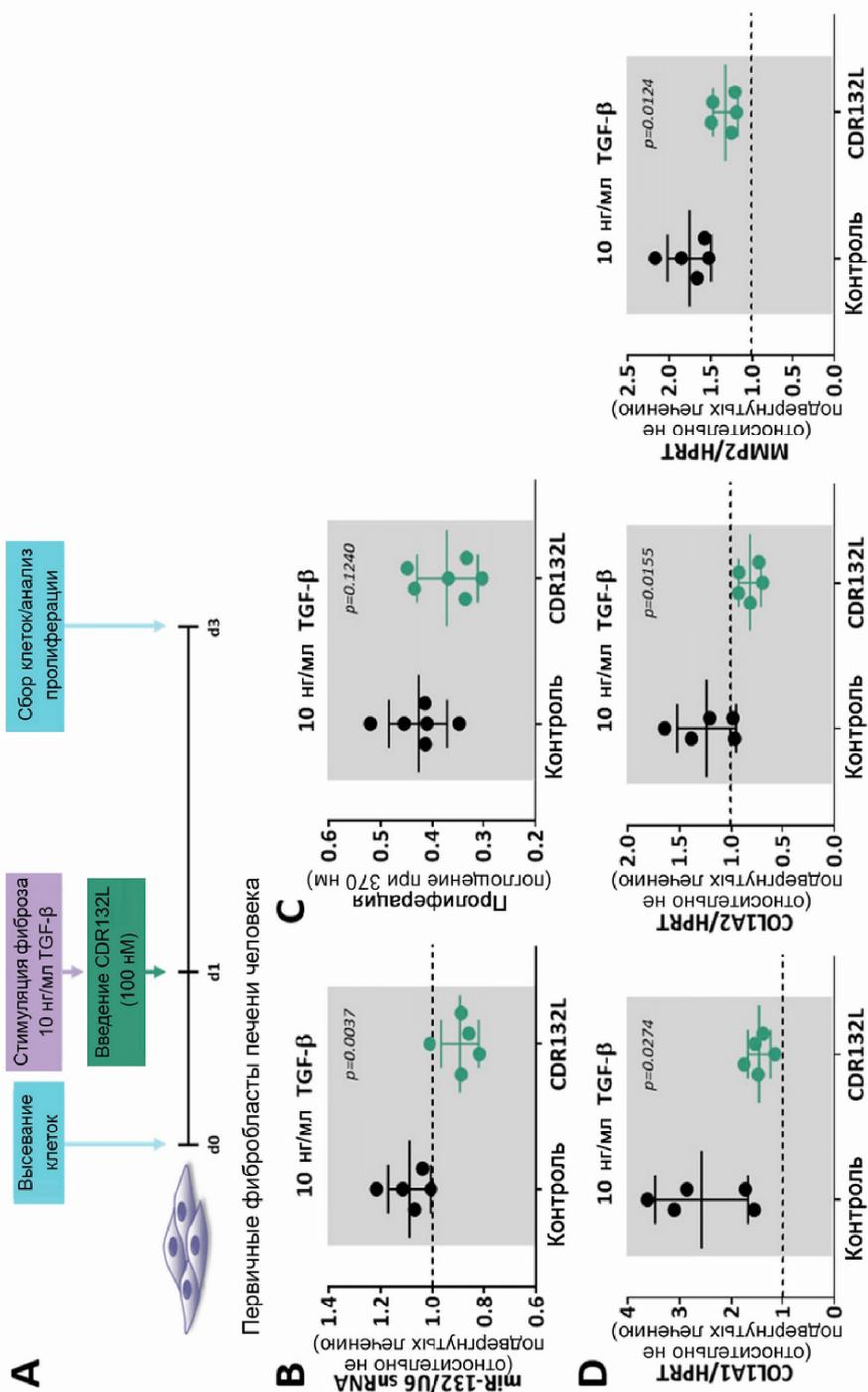
ФИГ. 16



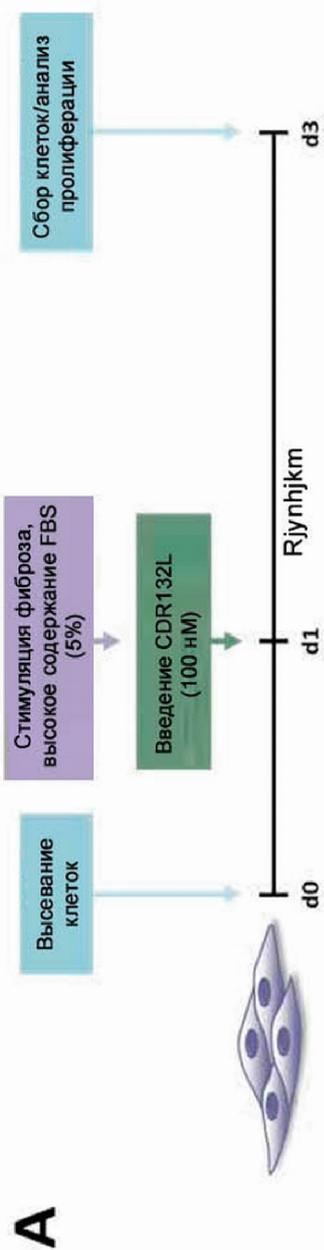
ФИГ. 17



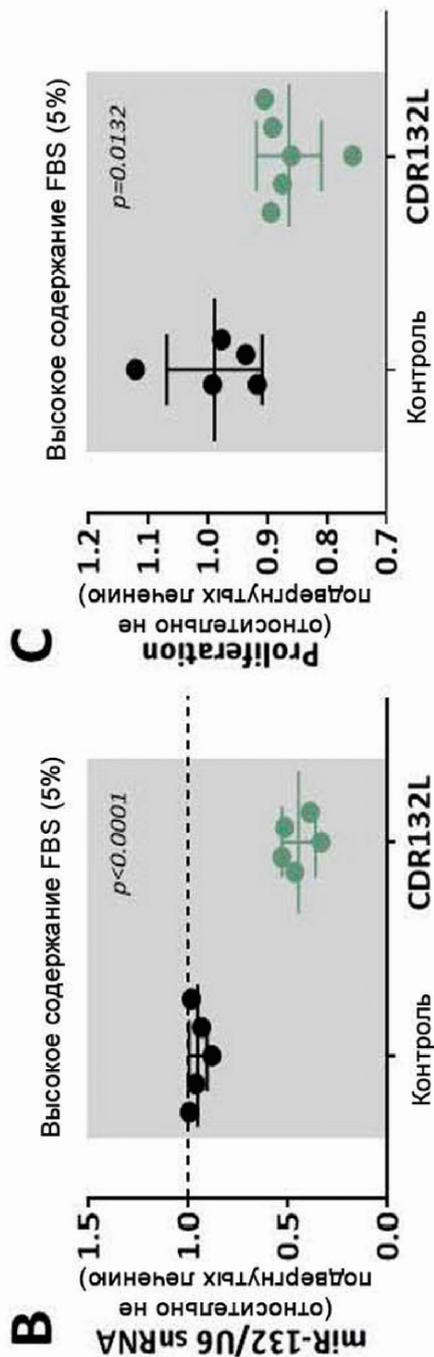
**ФИГ. 18**



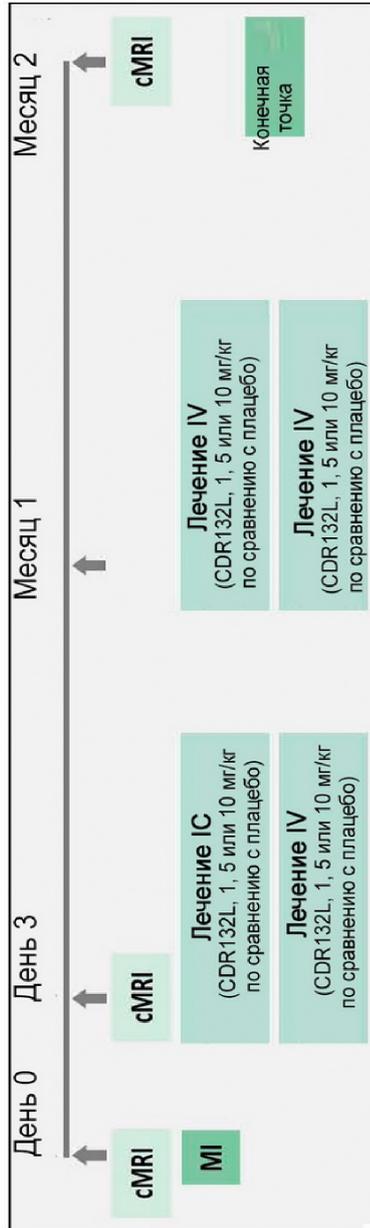
ФИГ. 19



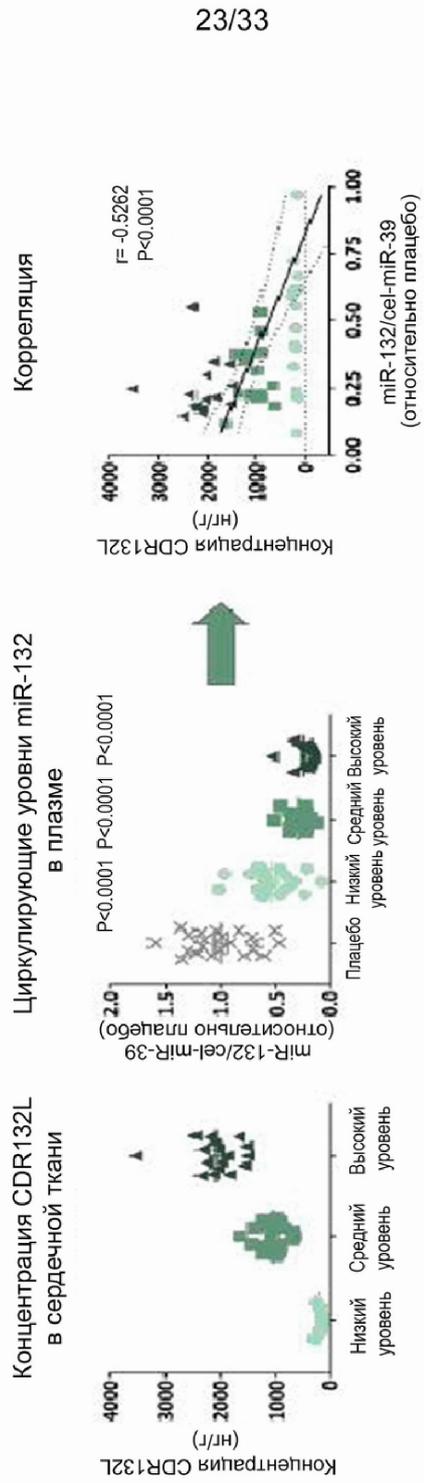
Первичные фибробласты легких человека



ФИГ. 20

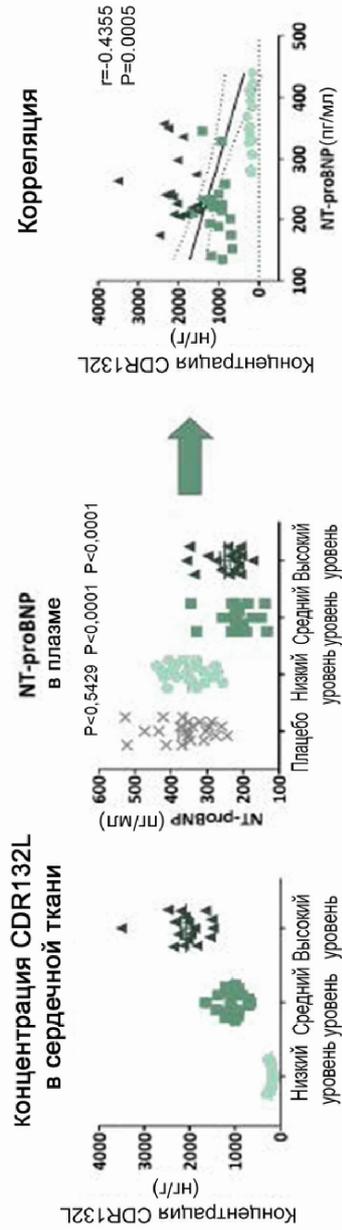


Фиг. 21

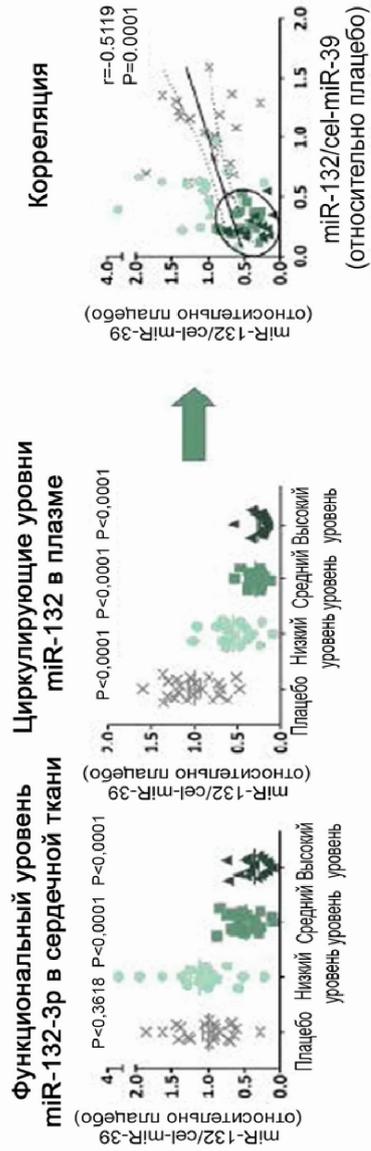


ФИГ. 22

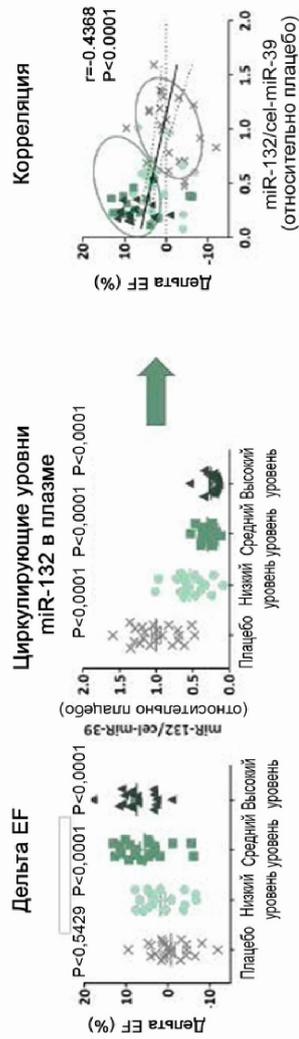
ФИГ. 23



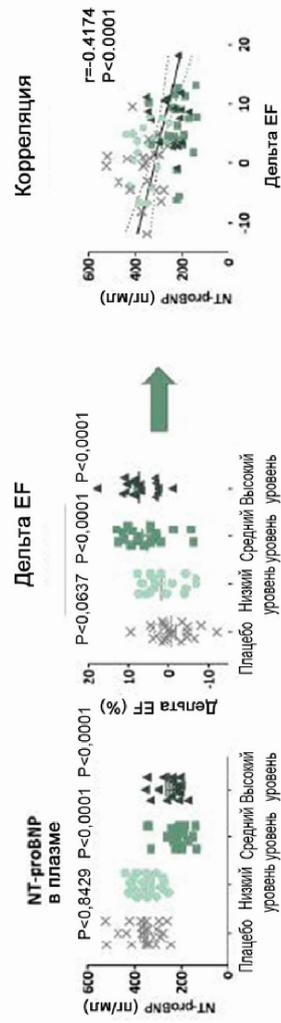
ФИГ. 24



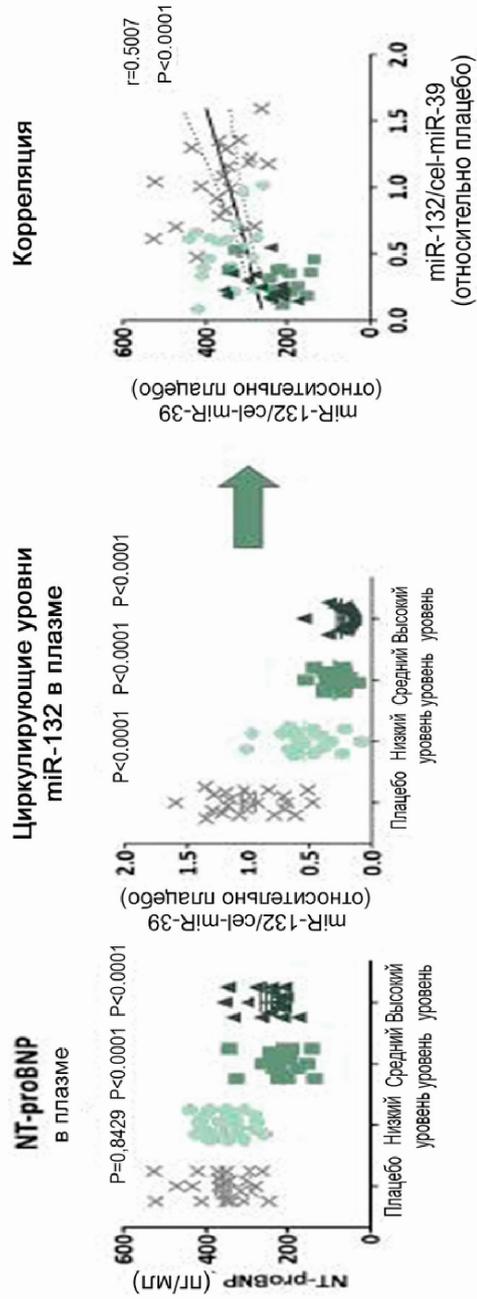
ФИГ. 25



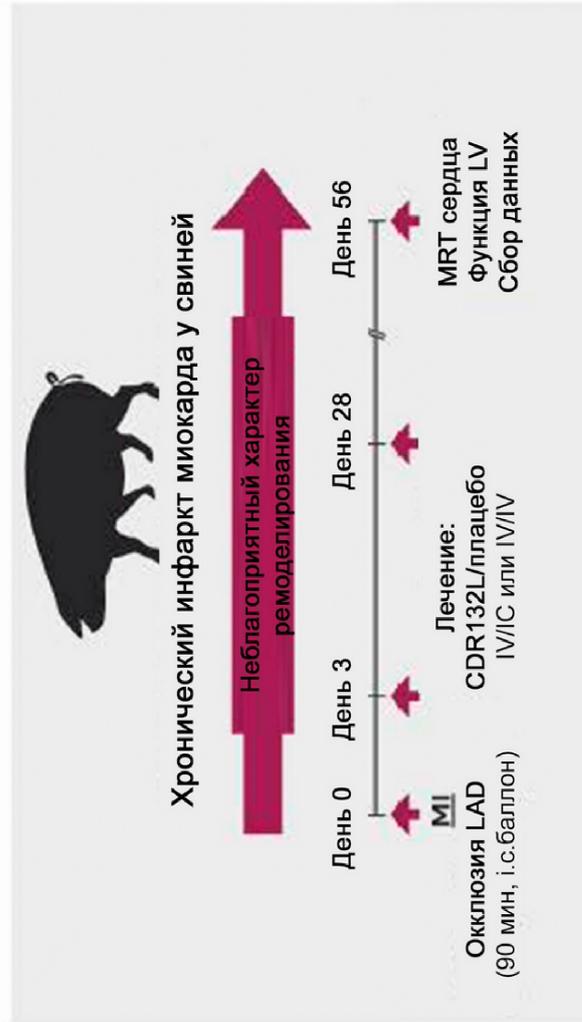
ФИГ. 26



26/33

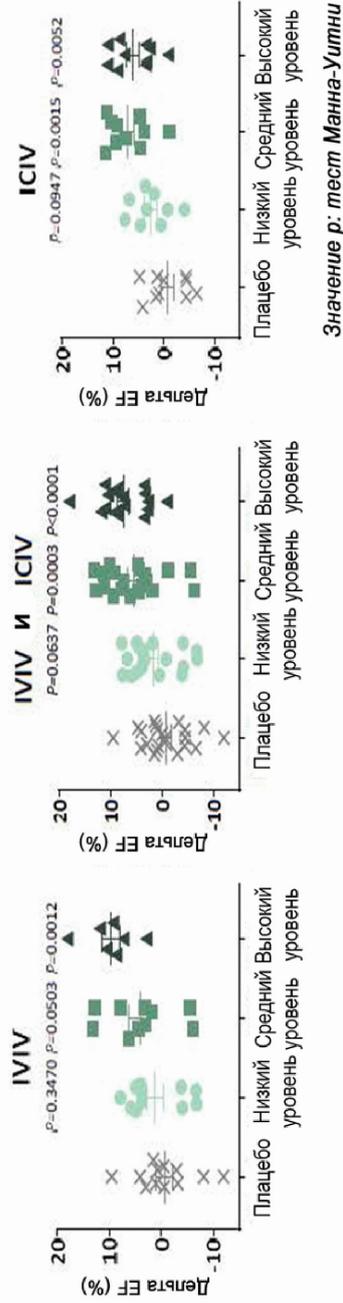


ФИГ. 27

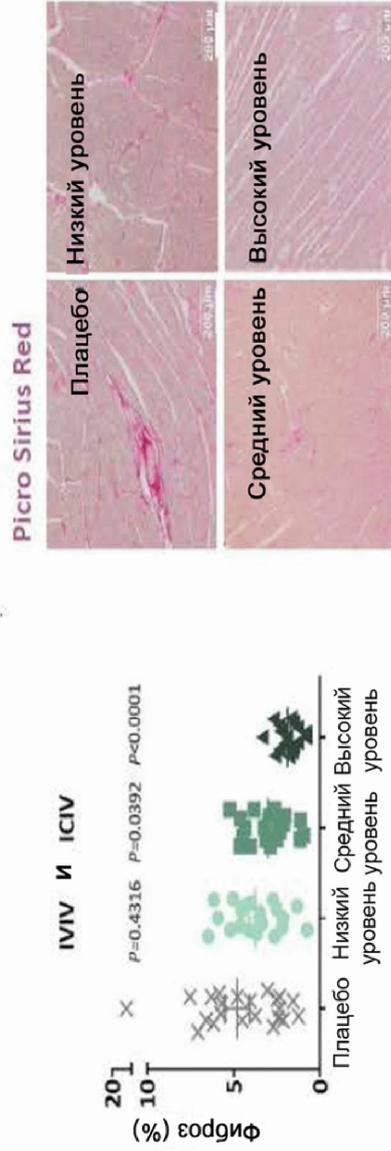


Фиг. 28

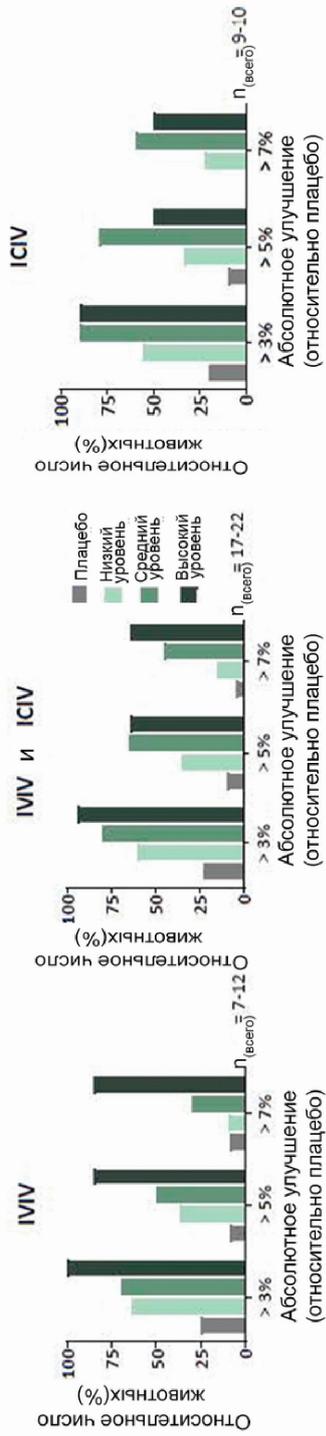
ФИГ. 29



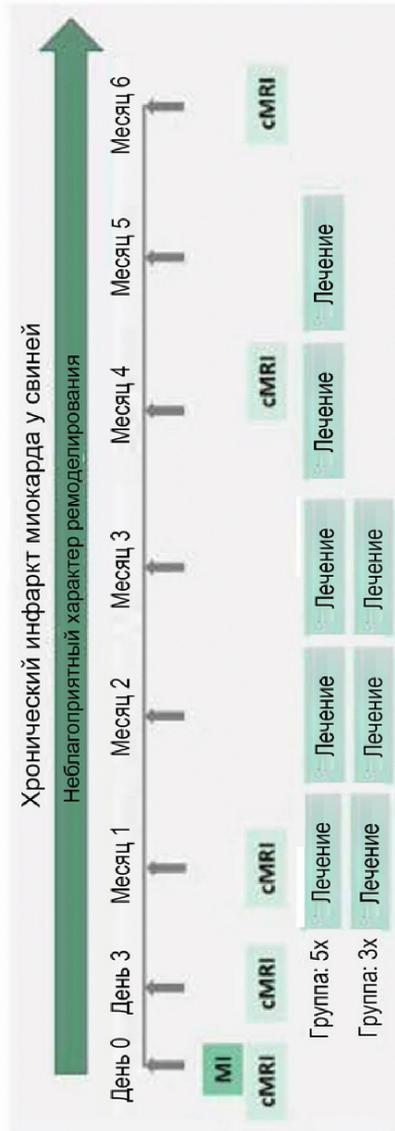
ФИГ. 30

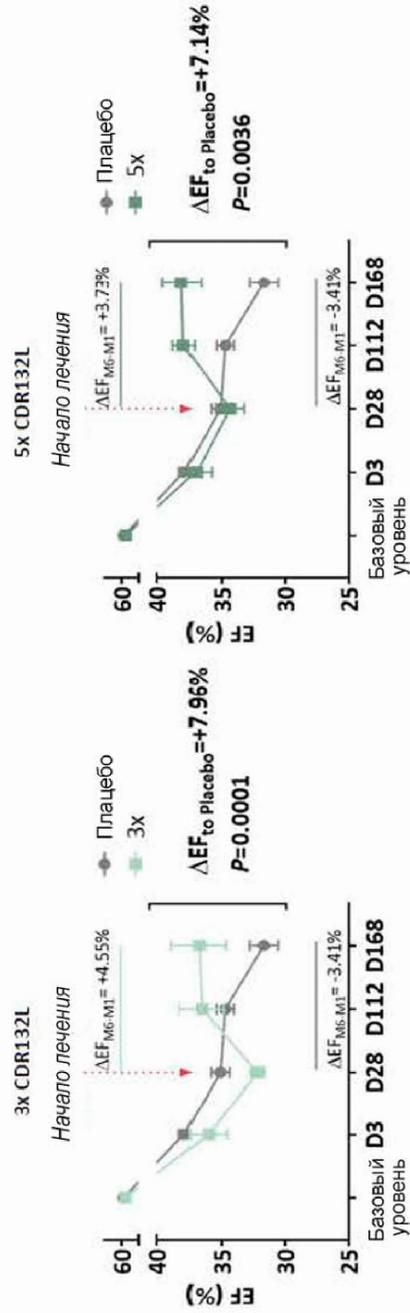


ФИГ. 31



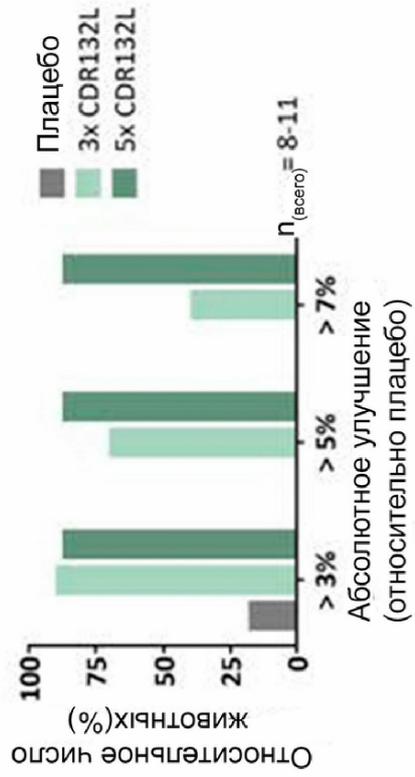
ФИГ. 32





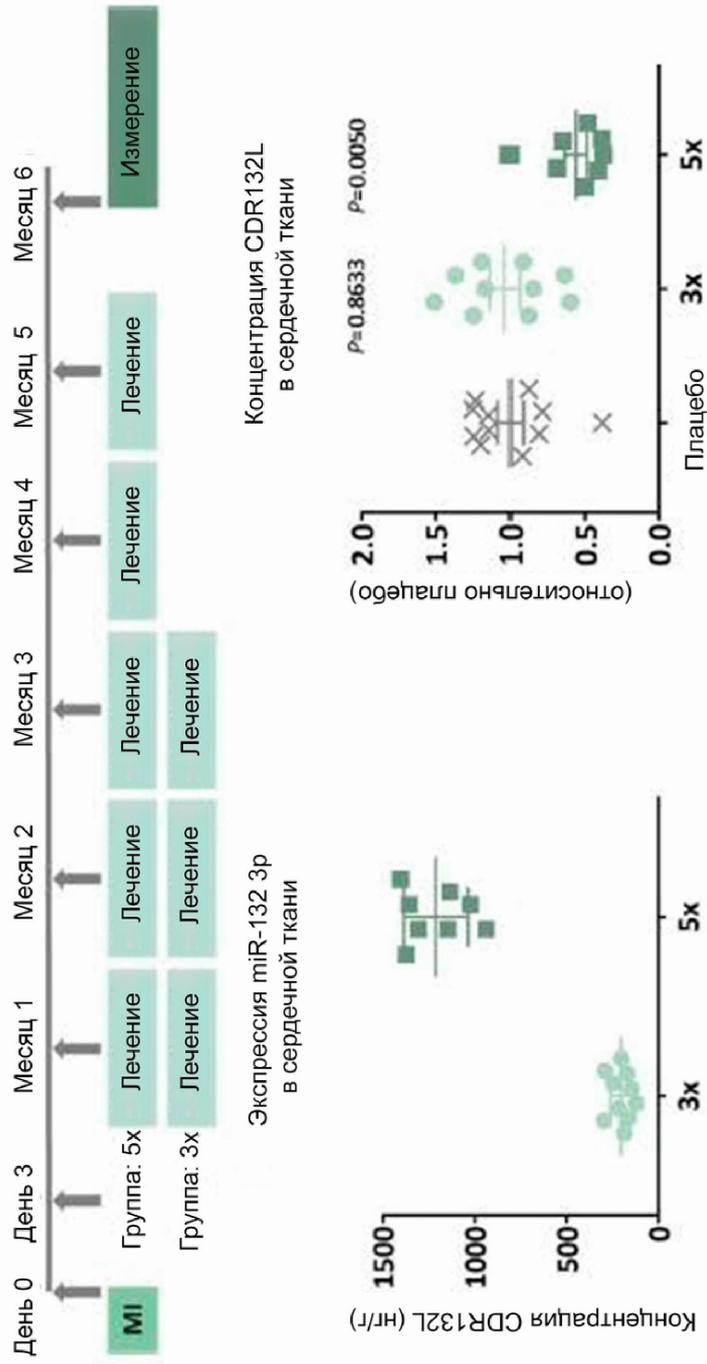
ФИГ. 33

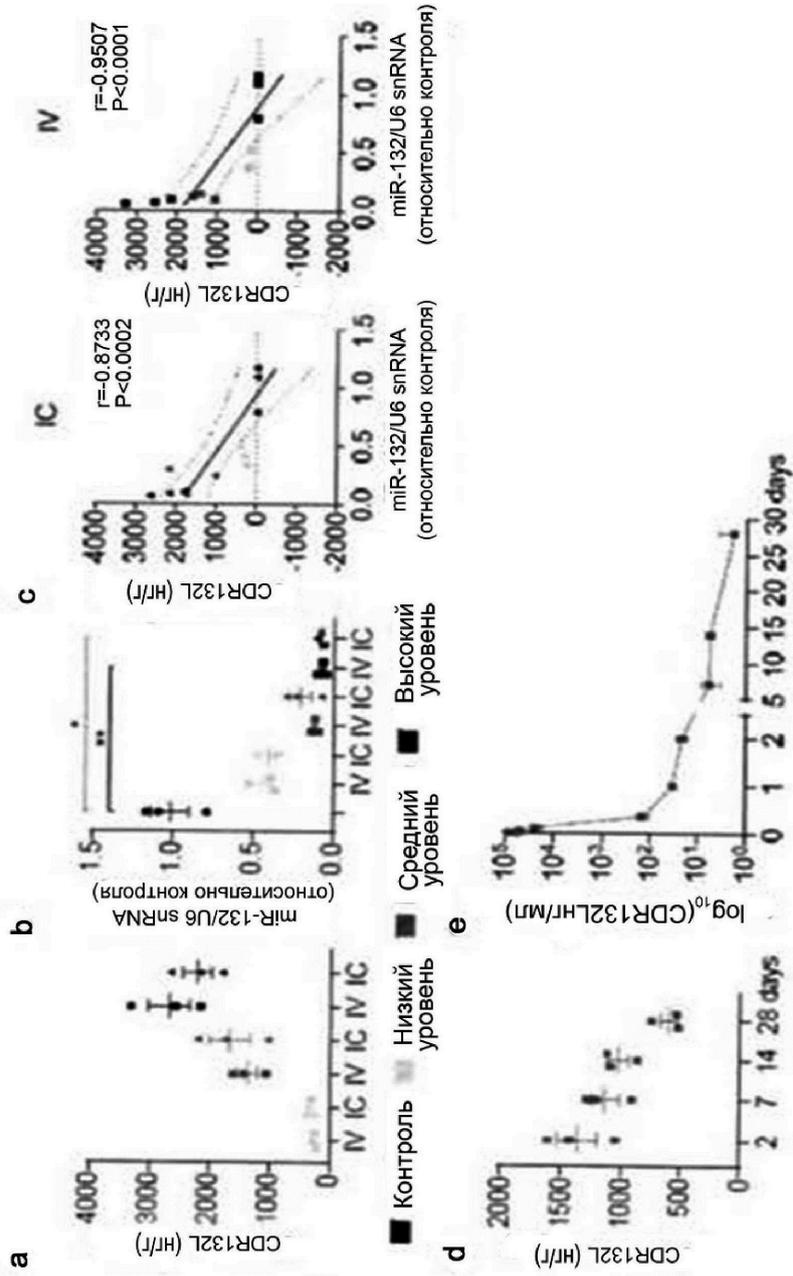
31/33



ФИГ. 34

ФИГ. 35





ФИГ. 36