

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038527**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.09.10

(21) Номер заявки
201790379

(22) Дата подачи заявки
2015.09.03

(51) Int. Cl. *A61K 45/06* (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 31/56 (2006.01)
A61K 31/573 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

(54) **СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ РЕСПИРАТОРНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ ИЛИ СОСТОЯНИЯ, КОМПОЗИЦИИ И НАБОРЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ДВОЙНОЙ ИНГИБИТОР КИНАЗ РІЗК ДЕЛЬТА-ГАММА И КОРТИКОСТЕРОИД**

(31) 4287/CHE/2014

(32) 2014.09.03

(33) IN

(43) 2017.06.30

(86) PCT/IB2015/056720

(87) WO 2016/035032 2016.03.10

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РИЗЕН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ СА
(CH)**

(72) Изобретатель:
**Кумар Венката Сатъя Ваккаланка
Сваруп (CH), Висванадха Срикант
(IN)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) WO-A1-2012151525
WO-A1-2014072937

(57) Изобретение относится к способу лечения респираторных заболеваний или состояний, например астмы, ХОБЛ и идиопатического фиброза легких (ИФЛ). Предложенный способ включает введение двойного ингибитора РІЗК дельта и гамма и кортикостероида. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим двойной ингибитор РІЗК дельта и гамма и кортикостероид.

B1**038527****038527****B1**

Заявка на данное изобретение испрашивает приоритет на основании заявки на патент Индии 4287/CHE/2014, поданной 03 сентября 2014 г., содержание которой включено в настоящий документ во всей полноте посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к способу лечения респираторных заболеваний и состояний, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, двойного ингибитора PI3K дельта/гамма и по меньшей мере одного кортикостероида. В предпочтительных вариантах реализации указанный способ относится к лечению идиопатического фиброза легких (ИФЛ), астмы, хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) и любой их комбинации.

Уровень техники

Респираторные заболевания, такие как идиопатический фиброз легких (ИФЛ), ХОБЛ и астма, представляют собой хронические и во многих случаях прогрессирующие заболевания, связанные с нарушением регуляции или повышенной активностью иммунной системы, соответственно. Причины и движущие силы указанных заболеваний выяснены не до конца. Указанные заболевания, как правило, характеризуются сложными клеточными взаимодействиями между множеством воспалительных клеток врожденной и адаптивной иммунной системы. Соответственно, гетерогенность и сложность этиологии заболевания при указанных состояниях делают поиск новых соответствующих клеточных мишеней затруднительным, так как неясно, какой компонент клеточного инфильтрата влияет на развитие патологии, а какой остается в стороне. Таким образом, направленное воздействие на сигнальные молекулы, которые требуются для активации совокупности иммунных клеток, может иметь хорошие шансы на успех в борьбе с указанными хроническими заболеваниями, опосредованными иммунными клетками.

Астма является наиболее распространенным хроническим заболеванием у детей, но также поражает и миллионы взрослых. По всему миру от указанного заболевания страдает примерно 235 миллионов человек. Причины астмы остаются до конца не понятыми, однако существуют эффективные лекарственные средства, которые могут излечивать астму и тем самым позволяют избежать сокращения продолжительности жизни, ограничения трудоспособности и смерти, к которым может приводить астма. К сожалению, для множества людей с астмой, в частности для бедных слоев населения, указанные эффективные способы лечения являются слишком дорогими или недоступны вовсе.

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) представляет собой широко распространенное состояние и является основной причиной заболеваемости и смертности по всему миру. При прогрессировании заболевания у пациентов с ХОБЛ часто может появляться предрасположенность к обострениям, что приводит к появлению тревоги у пациента, ухудшению состояния здоровья, нарушению функции легких и повышению уровня смертности. Указанные случаи ухудшения респираторной функции приводят к увеличению расходования ресурсов органов здравоохранения, числа случаев госпитализации и затрат на госпитализацию. Более того, частые обострения связаны с ускоренной потерей функции легких, что тем самым сокращает ожидаемую продолжительность жизни.

Согласно рекомендациям Глобальной инициативы по хронической обструктивной болезни легких (GOLD) способом лечения первой линии при ХОБЛ являются β -агонисты долгосрочного действия, мускариновые антагонисты долгосрочного действия и ингалируемые кортикостероиды. Тем не менее указанные лекарственные средства снижают симптомы и обострения, связанные с заболеванием, но не действуют направленно на его молекулярную и клеточную основу. Соответственно, сохраняется необходимость в дополнительном усовершенствовании способов лечения ХОБЛ.

Фосфоинозитид-3-киназа (PI3K) принадлежит к классу внутриклеточных липидных киназ, которые фосфорилируют гидроксильную группу в положении 3 инозитольного кольца фосфоинозитидных липидов (PI) и вырабатывают вторичные липидные мессенджеры. Изоформы альфа и бета распространены повсеместно, при этом изоформы дельта и гамма экспрессируются только кроветворными клетками в кровотоке и клетками эндотелия. В отличие от PI3K-альфа или бета у мышей, у которых отсутствует экспрессия изоформ гамма или дельта, какие-либо нежелательные фенотипы не наблюдались, и это указывает на то, что направленное действие на указанные специфические изоформы не вызывает избыточную токсичность.

В последнее время было сделано предположение о применении направленных ингибиторов пути фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) в качестве иммуномодулирующих агентов. Указанный интерес обусловлен тем фактом, что путь PI3K выполняет несколько функций в сигнальной системе иммунных клеток, главным образом за счет выработки фосфатидилинозитол (3,4,5)-трифосфата (PIP3), вторичного мессенджера, связанного с мембраной. PIP3 обеспечивает рекрутинг белков к двойному слою липидов со стороны цитоплазмы, включая протеинкиназы и ГТФазы, и инициирует сложную сеть последующих сигнальных каскадов, которые важны для регуляции адгезии, миграции иммунных клеток и межклеточной коммуникации.

Четыре изоформы PI3K I класса имеют различное распределение в тканях. PI3K α и PI3K β распространены повсеместно и активируются после рецепторных тирозинкиназ (RTK), тогда как PI3K δ и PI3K γ ограничены главным образом гемопоэтическими клетками и клетками эндотелия и активируются после

РТК и рецепторов, сопряженных с G-белком (GPCR) соответственно. В генетических исследованиях на мышцах было определено, что PI3K α и PI3K β являются незаменимыми для нормального развития, тогда как мыши с потерей PI3K δ и/или PI3K γ дают жизнеспособное потомство с селективным иммунодефицитом.

Профиль экспрессии и функции PI3K δ и PI3K γ привлекли повышенный интерес к разработке ингибиторов PI3K δ/γ в качестве агентов для лечения множества заболеваний, включая ревматоидный артрит, аллергию, астму, хроническую обструктивную болезнь легких и рассеянный склероз (Hirsch et al., *Pharmacol. Ther.*, 118, 192-205, 2008; Marone et al., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1784, 159-185, 2008; Rommel et al., *Nat. Rev. Immunol.*, 7, 191-201, 2007; Ruckle et al., *Nat. Rev. Drug Discov.*, 5, 903-918, 2006). В исследованиях, в которых одновременно применяли фармакологические и генетические способы, было показано, что две указанные изоформы часто вступают в синергические взаимодействия друг с другом (Konrad et al., *J. Biol. Chem.*, 283, 33296-33303, 2008; Laffargue et al., *Immunity*, 16, 441-451, 2002).

В мастоцитах, например, PI3K δ является незаменимой для дегрануляции в ответ на перекрестную сшивку Fc-рецепторов под действием IgE (Ali et al., *J. Immunol.*, 180, 2538-2544, 2008), при этом PI3K γ играет важную роль при усилении ответа (Laffargue et al., *Immunity*, 16, 441-451, 2002). Схожие эффекты наблюдали и в отношении других клеточных функций, включая хоминг лимфоцитов и респираторный взрыв нейтрофилов, где PI3K γ играет ключевую роль и PI3K δ усиливает каждый из процессов. Недублируемые, но взаимосвязанные роли PI3K δ и PI3K γ делают затруднительным определение того, какая из двух указанных изоформ (по отдельности или в комбинации) является наилучшей мишенью при конкретном воспалительном нарушении. Исследования, в которых использовали мышей, у которых отсутствовали PI3K δ и/или PI3K γ или у которых экспрессировались формы PI3K δ и PI3K γ , не имеющие киназную активность, имели определенную ценность для понимания роли указанных изоформ. Например, у мышей с нокаутом гена PI3K δ были продемонстрированы пониженный хемотаксис нейтрофилов, пониженная выработка антител (зависящая или независящая от Т-клеток) (Jou et al., *Mol. Cell. Biol.*, 22, 8580-8591, 2002) и пониженное количество созревших В-клеток (Clayton et al., *J. Exp. Med.*, 196, 753-763, 2002; Jou et al., *Mol. Cell. Biol.*, 22, 8580-8591, 2002) и снижение пролиферации в ответ на антитело к IgM (Jou et al., *Mol. Cell. Biol.*, 22, 8580-8591, 2002). Указанный фенотип реплицировался в случае изоформы PI3K δ , не имеющей киназной активности, и при применении селективных ингибиторов PI3K δ также происходило снижение числа мастоцитов и их пролиферации и ослабление аллергического ответа. У мышей с нокаутом PI3K γ , у которых наблюдали более высокое количество нейтрофилов, обладающих пониженной чувствительностью, более низкое количество макрофагов и дендритных клеток, обладающих пониженной чувствительностью, отмечали снижение дегрануляции мастоцитов ((Laffargue et al., *Immunity*, 16, 441-451, 2002), повышенное отношение Т-клеток CD4⁺ к CD8⁺), повышенный апоптоз тимоцитов, пониженную индукцию CXCR3 в активированных Т-клетках и пониженную сердечную сократимость. Указанное последним негативное воздействие на сердечную ткань представляет собой проблему при хроническом введении ингибиторов PI3K γ пациентам. Тем не менее указанная проблема была в значительной степени устранена в случае варианта PI3K γ , не имеющего киназной активности (который лучше имитирует ингибирование киназы по сравнению с отсутствием белка), при этом наблюдали схожие фенотипы иммунных клеток, но, что важно, не наблюдали дефекты сердечной ткани. Как было показано позднее, действие в сердечной ткани было вызвано поддерживающим действием, но не каталитической активностью PI3K γ . Мыши с двойным нокаутом PI3K δ /PI3K γ были жизнеспособными, но у них наблюдали серьезные дефекты при развитии Т-клеток и выживаемости тимоцитов. Комбинация нокаут PDK γ /PI3K δ киназа, не имеющая киназной активности, обеспечивала схожий фенотип, это позволяет предположить, что по меньшей мере в рамках иммунной системы PI3K δ , вероятно, имеет исключительно каталитическую функцию. Интерпретация исследований, в которых использовали мышей с нокаутными генами и киназами, не имеющими киназную активность, может быть затруднительной, так как указанные модели обеспечивают исключительно картину стационарного состояния иммунной системы, в них отсутствует контроль времени и дозы, и они не позволяют понять в полной степени влияние обратимого ингибирования на динамический иммунный ответ. Для оценки относительных вкладов каждой PI3K при активации иммунных клеток в исследованиях сигнальной системы лейкоцитов необходимо применять селективные ингибиторы, имеющие различные профили (PI3K δ , PI3K γ и PI3K δ/γ), (см. Olusegun et al., *Chemistry & Biology*, 1, 123-134, включая ссылки, приведенные в указанной работе).

Существуют веские основания для применения двойного ингибирования PI3K δ/γ в качестве стратегии вмешательства при аллергическом и неаллергическом воспалении дыхательных путей и других аутоиммунных заболеваниях. Научное подтверждение участия PI3K- δ и γ в различных клеточных процессах, лежащих в основе астмы и ХОБЛ, было получено в исследованиях ингибиторов и в подходах с направленным действием на гены. Кроме того, устойчивость к традиционным способам лечения, таким как использование кортикостероидов, у некоторых пациентов с ХОБЛ связывали с повышающей регуляцией пути PI3K δ/γ . Прерывание сигнальной системы PI3K δ/γ , таким образом, обеспечивает новую стратегию, направленную на противодействие воспалительному иммунному ответу. Поскольку PI3K δ и γ влияют на

функции воспалительных клеток, такие как миграция, активация лейкоцитов и дегрануляция мастоцитов, блокирование указанных изоформ может являться эффективной стратегией также и при лечении ревматоидного артрита. С учетом установленной важности указанных изоформ при иммунном надзоре можно ожидать, что ингибиторы, специфически и направленно действующие на изоформы дельта и гамма, будут замедлять прогрессирование иммунного ответа, происходящего при воспалении дыхательных путей и ревматоидном артрите. С учетом установленной важности указанных изоформ при иммунном надзоре можно ожидать, что ингибиторы, специфически и направленно действующие на изоформы δ и γ , будут замедлять прогрессирование иммунного ответа, происходящего при воспалении дыхательных путей и ревматоидном артрите (William et al., *Chemistry & Biology*, 17:123-134, 2010; и Thompson, et al., *Chemistry & Biology*, 17:101-102, 2010). Обзоры и исследования, связанные с PI3K и родственными путями протеинкиназ, приведены в Pixu Liu et. al. (*Nature Reviews Drug Discovery*, 2009, 8, 627-644); Nathan T. et al., *Mol. Cancer Ther.*, 2009; 8(1) Jan., 2009); Romina Marone et al., *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1784 (2008) 159-185), и B. Markman et al., *Annals of Oncology*, Advance Access, опубликовано в августе 2009 г.). Схожие обзоры и исследования, касающиеся роли PI3K δ и γ , приведены в William et al., *Chemistry & Biology*, 17:123-134, 2010, и Timothy et al., *J. Med. Chem.*, опубликовано в сети Интернет 27 августа 2012 г. Содержание всех указанных литературных документов включено в настоящее описание во всей полноте посредством ссылок для всех задач.

Сообщалось, что разработанные в последнее время соединения, такие как IPI-145 и CAL130, также являются двойными ингибиторами PI3K δ/γ . IPI-145 находится на стадии клинических испытаний для лечения рака, а также астмы. На момент подачи заявки на данное изобретение сообщения об исследованиях CAL-130 для каких-либо клинических задач отсутствовали.

В настоящем описании также содержатся ссылки на международную заявку на патент PCT/IB2010/002804, поданную 3 ноября 2010 г., и PCT/US2012/36594, поданную 4 мая 2012 г.; заявки на патент США № 12/938609, поданную 3 ноября 2010 г., и 13/464587, поданную 4 мая 2012 г., а также на соединения, раскрытые в международных публикациях WO 2009/088986, WO 2009/088990, WO 2011/008302 и WO 2012/097000, содержание каждой из которых включено в настоящий документ во всей полноте посредством ссылок для всех задач.

Кортикостероиды представляют собой высокоактивные противовоспалительные агенты, которые могут снижать количество, активность и подвижность клеток воспаления. Кортикостероиды традиционно применяют для лечения широкого диапазона хронических и острых воспалительных состояний, включая астму, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ) и аллергический ринит. Действие кортикостероидов опосредовано глюкокортикоидным рецептором (GR). Связывание кортикостероидов с GR инициирует ядерную транслокацию, которая, в свою очередь, влияет на ряд нижележащих путей посредством механизмов, зависящих от связывания ДНК (например, путем трансактивации) и независящих от него (например, путем трансэкспрессии).

В настоящее время кортикостероиды для лечения хронических воспалительных состояний в легких (таких как астма и ХОБЛ) вводят путем ингаляции. Одним из преимуществ применения ингалируемых кортикостероидов (ICS) является возможность доставки лекарственного средства непосредственно к участку действия, что тем самым ограничивает системные побочные эффекты и приводит к более быстрому клиническому ответу и повышенному терапевтическому индексу.

Несмотря на то, что лечение с применением ICS может оказывать значительное благоприятное действие, в частности при астме, важно минимизировать системное воздействие ICS, которое приводит к появлению и повышению тяжести нежелательных побочных эффектов, которые могут быть связаны с долгосрочным введением. Кроме того, ограниченная продолжительность действия ICS, доступных в настоящее время в клинической практике, вносит свой вклад в снижение оптимальности контроля заболевания. В то время как технология с применением ингалятора важна для направленной доставки в легкие, модуляция заместителей при молекулярном остове кортикостероидов важна для оптимизации свойств фармакокинетики и фармакодинамики для снижения пероральной биодоступности, ограничения области проявления фармакологической активности только легкими (для пролекарств и "мягких" лекарственных средств) и повышения системного клиренса. Кроме того, активность ICS долгосрочного действия в легких является крайне желательной, так как введение ICS один раз в день позволит снизить частоту введения и, таким образом, по существу улучшить соблюдение пациентом схемы лечения и в результате этого эффективность борьбы и контроля заболевания. В целом, в медицине нарастает потребность в разработке ICS с улучшенными характеристиками фармакокинетики и фармакодинамики.

Изоксазолидиновые производные глюкокортикоидов описаны, например, в WO 2006/005611, патенте Великобритании 1578446 и в "Synthesis and topical anti-inflammatory activity of some steroidal [16 α ,17 α -d]isoxazolidines", M.J. Green et al., *J. Med. Chem.*, 25, 1492-1495, 1982, содержание каждого из которых включено в настоящее описание во всей полноте посредством ссылки. Дополнительные изоксазолидиновые производные глюкокортикоидов также описаны в WO 2011/029547 и WO 2012/123482.

Несмотря на доступность в настоящее время способов терапевтического вмешательства, респираторные нарушения, такие как астма и ХОБЛ, остаются заболеваниями, для которых сохраняется значи-

тельная неудовлетворенная потребность в медицинском лечении.

Соответственно, задачей настоящего исследования является предложение способов и фармацевтических композиций для лечения респираторных заболеваний и состояний, имеющих повышенную активность. Фармацевтические композиции обеспечивают лечение респираторных заболеваний и состояний с применением более низкого количества активного(ых) соединения(ий) и/или обеспечивают более эффективное лечение респираторных заболеваний и состояний и тем самым минимизируют или не допускают возможные нежелательные эффекты, в общем случае связанные с разнообразными способами лечения, которые проводят с применением высоких доз активного соединения и/или в течение более продолжительного периода времени.

Согласно настоящему описанию указанная задача может быть решена путем объединения лекарственных средств, воздействующих на два различных, но при этом дополняющих друг друга пути, которые могут быть эффективными в более низких дозах по сравнению с применением любого из указанных ингибиторов по отдельности. Таким образом, в настоящем изобретении предложен эффективный подход для объединения двух различных сигнальных путей, которые сохраняют значительный терапевтический потенциал при объединении друг с другом. В частности, комбинация обеспечивает терапевтически благоприятное действие при снижении требований к терапевтически эффективной концентрации любого из или обоих агентов, выбранных из кортикостероида и двойного ингибитора Р1ЗК дельта-гамма.

Краткое описание изобретения

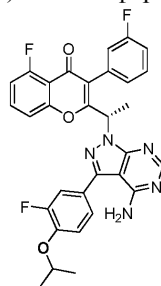
Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей двойной ингибитор Р1ЗК дельта и гамма и по меньшей мере один кортикостероид, и к применению указанной фармацевтической композиции для лечения респираторных заболеваний и состояний.

Один из вариантов реализации представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую двойной ингибитор Р1ЗК дельта и гамма и по меньшей мере один кортикостероид.

Другой вариант реализации представляет собой способ лечения пациента, страдающего от респираторного заболевания или состояния, включающий введение пациенту двойного ингибитора Р1ЗК дельта и гамма и по меньшей мере одного кортикостероида. В одном предпочтительном варианте реализации двойной ингибитор Р1ЗК дельта и гамма и по меньшей мере один кортикостероид вводят совместно в одной фармацевтической композиции. В одном предпочтительном варианте реализации заболевание или состояние представляет собой идиопатический фиброз легких (ИФЛ), астму или ХОБЛ.

Другой вариант реализации представляет собой применение комбинации двойного ингибитора Р1ЗК дельта и гамма и по меньшей мере одного кортикостероида для лечения у пациента респираторного заболевания или состояния, например, для лечения астмы или ХОБЛ.

В предпочтительном варианте реализации двойной ингибитор Р1ЗК дельта и гамма представляет собой соединение формулы А (показано ниже) или его фармацевтически приемлемую соль:



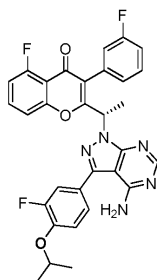
Формула А

Подходящие кортикостероиды включают, но не ограничиваются ими, дексаметазон, флутиказон, мометазон фуроат, флутиказона пропионат.

В предпочтительном варианте реализации кортикостероиды выбраны из дексаметазона, флутиказона и любой комбинации любых вышеуказанных агентов.

Один из вариантов реализации представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую соединение формулы А или его фармацевтически приемлемую соль и кортикостероид. В одном предпочтительном варианте реализации фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество соединения формулы А или его фармацевтически приемлемой соли и терапевтически эффективное количество кортикостероида (например, для лечения астмы или ХОБЛ).

Другой вариант реализации представляет собой способ лечения респираторного заболевания или состояния, такого как астма или ХОБЛ, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, соединения формулы А



Формула А

или его фармацевтически приемлемой соли и кортикостероида.

В одном предпочтительном варианте реализации соединение формулы А или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один кортикостероид вводят совместно в одной фармацевтической композиции. В одном из вариантов реализации заболевание или состояние представляет собой астму. В другом варианте реализации заболевание или состояние представляет собой ХОБЛ.

Другой вариант реализации представляет собой способ лечения пациента, страдающего от респираторного заболевания или состояния, такого как астма или ХОБЛ, включающий введение пациенту соединения формулы А или его фармацевтически приемлемой соли и кортикостероида, выбранного из дексаметазона, флутиказона или любой их комбинации. В одном предпочтительном варианте реализации соединение формулы А или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один кортикостероид вводят совместно в одной фармацевтической композиции.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1А приведена столбчатая диаграмма, на которой изображено влияние соединения А на IC_{50} дексаметазона (Dex) в клетках A549, обработанных TGF- β 1, согласно способу, описанному в примере 1.

На фиг. 1В приведена столбчатая диаграмма, на которой изображено влияние соединения А на IC_{50} дексаметазона (Dex) в отношении концентрации IL-8 в клетках U937, обработанных H_2O_2 , согласно способу, описанному в примере 2.

На фиг. 2А приведена столбчатая диаграмма, на которой изображено действие соединения А на инфильтрацию иммунных клеток, индуцированную сигаретным дымом, в BALF у мышей Balb/c согласно способу, описанному в примере 3.

На фиг. 2В приведена столбчатая диаграмма, на которой изображено действие соединения А на цитокины в BALF согласно способу, описанному в примере 3.

На фиг. 3А приведена столбчатая диаграмма, на которой изображено действие соединения А и флутиказона на инфильтрацию макрофагов, индуцированную сигаретным дымом, в BALF у мышей Balb/c согласно способу, описанному в примере 4.

На фиг. 3В приведена столбчатая диаграмма, на которой изображено действие комбинации соединения А и флутиказона на инфильтрацию макрофагов, индуцированную сигаретным дымом, в BALF у мышей Balb/c согласно способу, описанному в примере 4.

На фиг. 4 приведена столбчатая диаграмма, на которой изображена кривая зависимости ингибирования нейтрофилов от концентрации IL-8 у здоровых пациентов и пациентов с ХОБЛ, которым проводили стимуляцию 5% CSE в присутствии соединения А (0,01 нМ - 100 мкМ) или дексаметазона, согласно способу, описанному в примере 6.

На фиг. 5 приведена столбчатая диаграмма, на которой изображено ингибирование высвобождения IL-8 в нейтрофилах, индуцированного CSE, у пациентов с ХОБЛ при добавлении дексаметазона в фиксированной концентрации 1 нМ к соединению А в концентрациях 0,1, 1 и 10 нМ, согласно способу, описанному в примере 6.

На фиг. 6 приведена столбчатая диаграмма, на которой изображена относительная экспрессия мРНК MKP1 при стимуляции 5% CSE, применяемым отдельно или в присутствии 10 или 100 нМ соединения А, согласно способу, описанному в примере 7.

На фиг. 7 приведена столбчатая диаграмма, на которой изображена относительная экспрессия мРНК PI3K γ при стимуляции 5% CSE, применяемым отдельно или в присутствии 10 или 100 нМ соединения А, согласно способу, описанному в примере 7.

На фиг. 8 приведена столбчатая диаграмма, на которой изображена выработка PIP3 в присутствии только 5% CSE, 5% CSE и 10 нМ соединения А или только 10 нМ соединения А.

Подробное описание изобретения

Согласно одному из аспектов способ объединения двойного ингибитора PI3K дельта и гамма (такого как соединение формулы А или его фармацевтически приемлемая соль) с кортикостероидом, таким как описано в любом из вариантов реализации настоящего изобретения, имеет активность (т.е. синергическую активность), значительно превышающую активность, которую можно было бы ожидать с учетом индивидуальной активности двойного ингибитора PI3K дельта и гамма или кортикостероида при их от-

дельном применении.

Согласно другому аспекту способ объединения двойного ингибитора РІЗК дельта и гамма (такого как соединение формулы А или его фармацевтически приемлемая соль) с кортикостероидом имеет активность, даже если чувствительность к кортикостероиду при его применении в качестве единственного агента отсутствует.

Таким образом, способы, описанные в настоящем документе, обеспечивают лечение респираторных заболеваний и состояний с применением более низкого количества активного(ых) соединения(ий) и/или обеспечивают более эффективное лечение респираторных заболеваний и состояний в течение более продолжительного периода времени.

Другой вариант реализации представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую двойной ингибитор РІЗК дельта и гамма (такой как соединение формулы А или его фармацевтически приемлемая соль) с кортикостероидом, для применения для лечения респираторного заболевания или состояния.

Другой вариант реализации представляет собой способ лечения респираторного заболевания или состояния, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению.

Другой вариант реализации представляет собой применение фармацевтической композиции согласно любому из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, для получения лекарственного средства, подходящего для лечения респираторного заболевания или состояния.

Двойной ингибитор РІЗК дельта и гамма (такой как соединение формулы А или его фармацевтически приемлемая соль) может присутствовать в фармацевтических композициях, описанных в настоящем документе, в форме, выбранной из сольватов, гидратов и/или солей с фармакологически приемлемыми кислотами или основаниями.

Кортикостероид может присутствовать в фармацевтических композициях, описанных в настоящем документе, в форме, выбранной из сольватов, гидратов или солей с фармакологически приемлемыми кислотами или основаниями.

Другой вариант реализации представляет собой способ лечения заболевания или нарушения, включающего воспаление (например, астмы, хронической обструктивной болезни легких). Способ включает введение эффективного количества одной или более композиций согласно настоящему изобретению.

Примеры иммунных нарушений, которые можно подвергать лечению с применением способов и композиций, описанных в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, астму, аллергический ринит, фиброз легких, кистозный фиброз и идиопатический фиброз легких (ИФЛ).

Фармацевтически приемлемые соли, такие как описано в настоящем документе, включают соли, полученные из неорганических оснований, таких как Li, Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn и Mn; соли органических оснований, таких как N,N'-диацетилэтилендиамин, глюкозамин, триэтиламин, холин, гидроксид, дициклогексиламин, метформин, бензиламин, триалкиламин и тиамин; соли хиральных оснований, таких как алкилфениламин, глицинол и фенилглицинол; соли природных аминокислот, таких как глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, норлейцин, тирозин, цистин, цистеин, метионин, пролин, гидроксипролин, гистидин, орнитин, лизин, аргинин и серин; четвертичные аммонийные соли соединений согласно настоящему изобретению с алкилгалогенидами, алкилсульфатами, такими как MeI (метилюдид) и (Me)₂SO₄; соли искусственных аминокислот, таких как D-изомеры или замещенные аминокислоты; соли гуанидина и соли замещенного гуанидина, где заместители выбраны из нитро, amino, алкила, алкенила, алкинила, соли аммония или замещенного аммония и соли алюминия. Соли могут включать соли присоединения кислоты, если это возможно, представляющие собой сульфаты, нитраты, фосфаты, перхлораты, бораты, гидрогалогениды, ацетаты, тартраты, малеаты, цитраты, фумараты, сукцинаты, пальмоаты, метансульфонаты, бензоаты, салицилаты, бензолсульфонаты, аскорбаты, глицерофосфаты и кетоглутараты.

Если в настоящем описании указаны диапазоны, то подразумевается, что они содержат все комбинации и подкомбинации диапазонов и их конкретных вариантов реализации.

Термин "примерно", если он относится к числу или числовому диапазону, означает, что описываемое число или числовой диапазон является приблизительным с поправкой на погрешность эксперимента (или в пределах статистической ошибки эксперимента), и, таким образом, указанное число или числовой диапазон может отличаться от приведенного числа или числового диапазона, например, в пределах от 1 до 15%.

Термин "содержащий" (и родственные термины, такие как "содержать", или "содержит", или "имеющий", или "включающий") включает варианты реализации, например вариант реализации любой заявленной композиции, композицию, способ или процесс и т.д., которые "состоят из" или "состоят по существу из" описанных отличительных признаков.

Следующие сокращения и термины имеют в настоящем описании указанные значения:

РІЗК-К = фосфоинозитид-3-киназа;

РІ = фосфатидилинозитол.

Сокращения, употребляемые в данном документе, имеют свое обычное значение в пределах химической и биологической области техники, если не указано иное.

Термин "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" относится к такому количеству соединения, описанного в настоящем документе, которое является достаточным для предполагаемого применения, включая, но не ограничиваясь ими, способ лечения заболевания, такой как определено ниже. Терапевтически эффективное количество может быть различным в зависимости от предполагаемого применения (*in vitro* или *in vivo*) или субъекта или болезненного состояния, подвергающегося лечению, например массы тела и возраста субъекта, тяжести болезненного состояния, способа введения и т.д., и может быть легко определено специалистами в данной области техники. Указанный термин также относится к дозе, которая вызывает конкретный ответ в клеточных мишенях, например, снижение адгезии тромбоцитов и/или миграции клеток. Конкретная доза может быть различной в зависимости от конкретных выбранных соединений, выбранного режима дозирования, возможного введения в комбинации с другими соединениями, времени введения, ткани, в которую проводят введение, и физической системы доставки, в которой проводят введение.

При употреблении в настоящем описании термины "способ лечения" и "лечение" относятся к подходу для получения благоприятных или целевых результатов, включая, но не ограничиваясь ими, терапевтическое благоприятное действие и/или профилактическое благоприятное действие. Под терапевтическим благоприятным действием понимают устранение или ослабление основного нарушения, подвергающегося лечению. Кроме того, терапевтическое благоприятное действие достигается при устранении или ослаблении одного или более физиологических симптомов, связанных с основным нарушением, при этом у пациента наблюдают улучшение, даже несмотря на то, что он все еще может быть поражен основным нарушением. Для обеспечения профилактического благоприятного действия композиции можно вводить пациенту, имеющему риск развития конкретного заболевания, или пациенту, сообщившему об одном или более физиологических симптомах заболевания, даже если диагноз указанного заболевания еще не поставлен.

Термин "терапевтическое действие" используют в настоящем документе для описания терапевтического благоприятного действия и/или профилактического благоприятного действия, таких как описано выше. Профилактическое действие включает отсрочку или недопущение появления заболевания или состояния, отсрочку или недопущение проявления симптомов заболевания или состояния, замедление, остановку или обращение вспять прогрессирования заболевания или состояния или любую их комбинацию.

Термин "субъект" или "пациент" относится к животному, такому как млекопитающее, например к человеку. Способы, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения человека и для ветеринарных применений. В некоторых вариантах реализации пациент представляет собой млекопитающее, и в некоторых вариантах реализации пациент представляет собой человека. В случае ветеринарных задач термин "субъект" и "пациент" включает, но не ограничивается ими, сельскохозяйственных животных, включая коров, овец, свиней, лошадей и коз; домашних животных, таких как собаки и кошки; экзотических животных и/или животных, содержащихся в зоопарках; лабораторных животных, включая мышей, крыс, кроликов, морских свинок и хомяков; и домашнюю птицу, такую как курица, индейка, утка и гусь.

Термин "селективное ингибирование" или "селективно ингибировать" при употреблении в отношении биологически активного агента относится к способности агента селективно снижать целевую сигнальную активность по сравнению с нецелевой сигнальной активностью за счет прямого или непрямого взаимодействия с мишенью.

При употреблении в настоящем описании термин "двойной ингибитор PI3-киназы дельта (δ) и гамма (γ)" в общем случае относится к соединению, которое более эффективно ингибирует активность изоферментов PI3-киназ δ и γ по сравнению с другими изоферментами семейства PI3K. Таким образом, соединение, представляющее собой двойной ингибитор PI3-киназы δ и γ , является более селективным в отношении PI3-киназы δ и γ по сравнению с традиционными ингибиторами PI3K, такими как CAL-130, вортманнин и LY294002, которые являются "неселективными ингибиторами PI3K". Примеры "двойных ингибиторов PI3-киназы дельта (δ) и гамма (γ)" включают, но не ограничиваются ими, соединения, такие как IPI-145, и соединения, раскрытые в международной заявке на патент PCT/IB2010/002804, поданной 3 ноября 2010 г., и PCT/US2012/36594, поданной 4 мая 2012 г.; в заявках на патент США № 12/938609, поданной 3 ноября 2010 г., и 13/464587, поданной 4 мая 2012 г., и соединения, раскрытые в международных публикациях WO 2009/088986, WO 2009/088990, WO 2011/008302 и WO 2012/097000, содержание каждой из которых включено в настоящий документ во всей полноте посредством ссылки для всех задач.

Например, двойной селективный ингибитор PI3-киназы δ и γ может относиться к соединению, которое имеет концентрацию 50% ингибирования (IC_{50}) в отношении PI3-киназы дельта и гамма I типа, которая по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 50 раз или по меньшей мере в 100 раз ниже по сравнению с IC_{50} ингибитора в отношении других типов PI3 киназ (т.е. альфа и бета).

Ингибирование PI3-киназы δ и γ может обеспечивать терапевтическое благоприятное действие при лечении различных состояний, например состояний, характеризующихся воспалительным ответом,

включая, но не ограничиваясь ими, аллергические заболевания. Важно отметить, что подавление функции РІЗ-киназы δ и γ , по-видимому, не влияет на биологические функции, такие как жизнеспособность и фертильность.

"Воспалительный ответ" при употреблении в настоящем описании характеризуется покраснением, повышением температуры, отеком и болью (т.е. воспалением) и, как правило, включает повреждение или разрушение ткани. Воспалительный ответ, как правило, представляет собой локализованный защитный ответ, возникающий при повреждении или разрушении ткани, который служит для уничтожения, разбавления или отделения (секвенирования) агента, вызывающего повреждение, и поврежденной ткани. Воспалительные ответы в значительной степени связаны с направленным поступлением лейкоцитов и/или хемотаксисом лейкоцитов (например, нейтрофилов). Воспалительные ответы могут возникать в результате инфицирования патогенными организмами и вирусами, по причинам, не связанным с инфекцией, таким как травма или реперфузия после инфаркта миокарда или инсульта, иммунных ответов на посторонние антигены и аутоиммунных заболеваний. Воспалительные ответы, восприимчивые к лечению с применением способов и соединений согласно настоящему изобретению, охватывают состояния, связанные с реакциями специфической защитной системы, а также состояния, связанные с реакциями неспецифической защитной системы.

Способы лечения согласно настоящему изобретению включают способы лечения состояний, связанных с активацией клеток воспаления. "Активация клеток воспаления" относится к индукции под действием стимула (включая, но не ограничиваясь ими, цитокины, антигены или аутоантитела) пролиферативного клеточного ответа, выработки растворимых медиаторов (включая, но не ограничиваясь ими, цитокины, радикалы кислорода, ферменты, простаноиды или вазоактивные амины) или экспрессии на клеточной поверхности новых медиаторов или повышенного количества медиаторов (включая, но не ограничиваясь ими, антигены главного комплекса гистосовместимости или молекулы клеточной адгезии) в воспалительных клетках (включая, но не ограничиваясь ими, моноциты, макрофаги, Т-лимфоциты, В-лимфоциты, гранулоциты (полиморфонуклеарные лейкоциты, включая нейтрофилы, базофилы и эозинофилы), мастоциты, дендритные клетки, клетки Лангерганса и клетки эндотелия). Специалистам в данной области техники будет понятно, что активация одного из указанных фенотипов указанных клеток или их комбинации может способствовать возникновению, поддержанию или обострению воспалительного состояния.

"Аллергическое заболевание" при употреблении в настоящем описании относится к любым симптомам, повреждению ткани или потере функции ткани, вызванным аллергией.

Один из вариантов реализации представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую двойной ингибитор РІЗК дельта и гамма (такой как соединение формулы А или его фармацевтически приемлемая соль) и по меньшей мере один кортикостероид и необязательно один или более фармацевтически приемлемых носителей или вспомогательных веществ.

В одном из вариантов реализации фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество двойного ингибитора РІЗК дельта и гамма (такого как соединение формулы А или его фармацевтически приемлемая соль) и по меньшей мере одного кортикостероида и необязательно один или более фармацевтически приемлемых носителей или вспомогательных веществ. Фармацевтическая композиция может включать один или более дополнительных активных ингредиентов, таких как описано в настоящем документе.

Фармацевтические носители и/или вспомогательные вещества могут быть выбраны из разбавителей, наполнителей, солей, разрыхлителей, связывающих веществ, смазывающих веществ, глидантов, увлажнителей, матриц с контролируемым высвобождением, красителей, вкусоароматических добавок, буферов, стабилизаторов, агентов, повышающих растворимость, и их комбинаций.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить отдельно или в комбинации с одним или более другими активными агентами. При желании, предложенные соединения и другой(ие) агент(ы) можно смешивать в одном препарате или оба компонента можно получать в виде отдельных препаратов для применения в комбинации по отдельности или одновременно.

Двойной ингибитор РІЗК дельта и гамма и кортикостероид можно вводить совместно или последовательно с одним или более другими активными агентами. При желании, предложенные соединения и другой(ие) агент(ы) можно вводить совместно, или оба компонента можно вводить последовательно для применения в виде комбинации.

Соединения и фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить при помощи любого способа, обеспечивающего доставку соединений к месту действия, такого как пероральный, интраназальный, местный (например, чрескожный), внутрь двенадцатиперстной кишки, парентеральный (включая внутривенный, внутриартериальный, внутримышечный, внутрисосудистый, интраперитонеальный или инъекцию или инфузию), внутрикожный, интрамаммарный, интратекальный, внутриглазной, ретробульбарный, внутрилегочный (например, в виде аэрозоля лекарственных средств) или подкожный (включая введение в виде депо для долгосрочного высвобождения, например введение под капсулу селезенки, в мозг или роговицу), подъязычный, анальный, ректальный, внутривагинальный или хирургическую имплантацию (например, введение под капсулу селезенки, в мозг или роговицу).

Композиции можно вводить в твердой, полутвердой, жидкой или газообразной форме или в виде высушенного порошка, такого как лиофилизированная форма. Фармацевтические композиции могут быть упакованы в формы, подходящие для доставки, включая, например, твердые лекарственные формы, такие как капсулы, сашеты, крахмальные капсулы, желатиновые капсулы, бумажные пакетики, таблетки, суппозитории, гранулы, пилюли, формованные пастилки и пастилы. Тип упаковки в общем случае зависит от целевого способа введения. Также включены имплантируемые составы с замедленным высвобождением и составы для чрескожного введения.

Частота дозирования соединений может быть различной. Например, двойной ингибитор РІЗК дельта и гамма можно вводить с частотой в диапазоне от двух раз в день до одного раза каждые три недели. Кортикостероид можно вводить с частотой в диапазоне от двух раз в день до одного раза каждые три недели.

Количество вводимого соединения зависит от млекопитающего, подвергающегося лечению, тяжести нарушения или состояния, скорости введения, фармакокинетики соединения и выбора лечащего врача. Тем не менее эффективная дозировка, которую вводят в виде одной или отдельных доз, находится в диапазоне от примерно 0,001 до примерно 100 мг на кг массы тела в день, предпочтительно от примерно 1 до примерно 35 мг/кг/день. Для человека весом 70 кг указанное количество составляет от примерно 0,05 до 7 г/день, предпочтительно от примерно 0,05 до примерно 2,5 г/день. Эффективное количество соединения согласно настоящему изобретению можно вводить в виде одной или нескольких доз (например, два или три раза в день).

В одном из вариантов реализации фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, содержат от примерно 0,001 до примерно 1000 мг, например от примерно 0,01 до примерно 500 мг, или от примерно 0,010 до примерно 250 мг, или от примерно 0,030 до примерно 125 мг двойного ингибитора РІЗК дельта и гамма (такого как соединение формулы А или его фармацевтически приемлемая соль) и/или от примерно 0,001 до примерно 1000 мг, например от примерно 0,01 до примерно 500 мг, или от примерно 0,010 до примерно 250 мг, или от примерно 0,010 до примерно 125 мг, или от примерно 0,030 до примерно 50 мг по меньшей мере одного кортикостероида.

В одном из вариантов реализации фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, содержат двойной ингибитор РІЗК дельта и гамма и кортикостероид в отношении от примерно 100:1 до примерно 1:100 по массе, например от примерно 50:1 до примерно 1:50 по массе, или от примерно 1:10 до примерно 10:1 по массе, или от примерно 1:5 до примерно 5:1 по массе.

Термин "совместное введение", "вводили в комбинации с" и их грамматические эквиваленты при употреблении в настоящем описании включают введение двух или более агентов (таких как двойной ингибитор РІЗК дельта и гамма и кортикостероид) животному таким образом, чтобы в организме животного одновременно присутствовали оба агента и/или их метаболиты. Совместное введение включает одновременное введение в отдельных композициях, введение в различное время в отдельных композициях или введение в композиции, в которой присутствуют оба агента.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут содержать один или более кортикостероидов, выбранных из дексаметазона, флутиказона, мометазона фуората, флутиказона пропионата и любой комбинации любых вышеуказанных кортикостероидов.

В определенных вариантах реализации кортикостероид выбран из дексаметазона, флутиказона и любой их комбинации.

Один конкретный вариант реализации настоящего изобретения относится к фармацевтическим композициям, где кортикостероид представляет собой флутиказон.

Другой конкретный вариант реализации настоящего изобретения относится к фармацевтическим композициям, где кортикостероид представляет собой дексаметазон.

Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к способу лечения показанного, выбранного из респираторных заболеваний и состояний, таких как заболевания дыхательных путей и легких, которые сопровождаются повышенной или измененной выработкой слизи, и/или воспалительных и/или обструктивных заболеваний дыхательных путей, таких как острый бронхит, хронический бронхит, хронический обструктивный бронхит (ХОБЛ), кашель, эмфизема легких, аллергический или неаллергический ринит или синусит, хронический синусит или ринит, полипы в носу, хронический риносинусит, острый риносинусит, астма, аллергический бронхит, альвеолит, болезнь сельскохозяйственных рабочих, гиперреактивность дыхательных путей, бронхит или пневмонит, вызванный инфекцией, например, бактериями или вирусами или гельминтами или грибами или простейшими или другими патогенами, детская астма, бронхиэктазия, фиброз легких, респираторный дистресс-синдром взрослых, отек бронхов и легких, бронхит или пневмонит или интерстициальный пневмонит различной природы, например, вызванный вдыханием, ингаляцией токсичных газов, паров, бронхит или пневмонит или интерстициальный пневмонит, вызванный сердечной недостаточностью, рентгеновским излучением, облучением, химиотерапией, бронхит или пневмонит или интерстициальный пневмонит, связанный с коллапсом, например эритематозная волчанка, системная склеродермия, фиброз легких, идиопатический фиброз легких (ИФЛ), интерстициальные заболевания легких или интерстициальный пневмонит различной природы, включая асбестоз, силикоз, саркоидоз М. Бека, гранулематоз, кистозный фиброз или муко-

висцидоз или дефицит α -1-антитрипсина; или выбранного из воспалительных заболеваний и состояний, таких как аллергические воспалительные заболевания рото- и носоглотки, и, в частности, выбранного из астмы, аллергического и неаллергического ринита и ХОБЛ, включающему введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению пациенту, нуждающемуся в этом.

Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к применению фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для получения лекарственного средства для лечения респираторных заболеваний и состояний, где, в частности, респираторные заболевания или состояния выбраны из астмы, аллергического и неаллергического ринита и ХОБЛ.

Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции согласно любому из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, для применения для лечения респираторных заболеваний и состояний, где, в частности, респираторные заболевания или состояния выбраны из астмы, аллергического и неаллергического ринита и ХОБЛ.

Далее настоящее изобретение будет дополнительно проиллюстрировано следующими неограничивающими примерами.

Примеры

Далее предложены иллюстративные примеры комбинаций двойного ингибитора PI3K дельта и гамма и кортикостероида.

Пример 1. Невосприимчивость к кортикостероиду, вызванная ФНО- β 1, в клетках A549.

Процедура испытания.

Клетки A549 трипсинизировали и высевали 2×10^4 клеток на лунку в 96-луночный планшет и инкубировали при 37°C и 5% CO₂.

Удаляли среду и добавляли 100 мкл бессывороточной среды, содержащей 0,1 мкМ соединения А, и инкубировали в течение 30 мин.

Добавляли 50 мкл 3X ФНО- β 1 в F12K, содержащей 0,5% БСА, таким образом, конечная концентрация составляла 400 пМ, и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 4 ч.

Добавляли 50 мкл дексаметазона (Dex) в 4X желаемой концентрации и инкубировали в течение 45 мин при 37°C и 5% CO₂.

Добавляли 50 мкл ФНО- α в 5X концентрации таким образом, конечная концентрация составляла 1 нг/мл для индуцирования IL-8, и инкубировали в течение 24 ч.

Собирали надосадочную жидкость и оценивали уровень IL-8 при помощи ELISA.

Исследование цитокинов.

Выделенные стрипы IL-8 помещали в планшеты совместно со свежеприготовленной или размороженной надосадочной жидкостью и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч или ночью при 4°C.

Содержимое отбрасывали и 5 раз промывали стрипы 200 мкл промывочного буфера на лунку в течение 15 с.

Проводили блоттинг стрипов после сушки и добавляли 100 мкл на лунку 1X детектирующего анти-тела и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч.

Содержимое отбрасывали и 5 раз промывали стрипы 200 мкл промывочного буфера на лунку в течение 15 с.

Проводили блоттинг стрипов после сушки и добавляли 100 мкл на лунку 1X анти-тела авидин-HRP и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин.

Содержимое отбрасывали и 5 раз промывали стрипы 200 мкл промывочного буфера на лунку в течение 15 с.

Добавляли 100 мкл на лунку субстрата TMB и инкубировали при комнатной температуре в течение 5-15 мин.

Реакцию останавливали путем добавления 50 мкл 2N H₂SO₄ на лунку. Поглощение анализировали на планшет-ридере при 450 и 570 нм.

Определяли значение ингибирования в %, используя значения поглощения, из которых вычитали результаты пустого эксперимента, который проводили в контрольных лунках. Строили графики зависимости по полученным данным с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (версия 5.02).

Результаты.

Результаты изображены на фиг. 1A. Соединение А (соед. А) снижало IC₅₀ дексаметазона в отношении концентрации IL-8 в клетках A549, обработанных ФНО- β 1, что указывает на значительное увеличение активности дексаметазона.

Пример 2. Индуцированная H₂O₂ невосприимчивость к кортикостероиду в клетках U937.

Процедура испытания.

Клетки U937 выдерживали в среде RPMI-1640, содержащей 15 мМ глутамин. 6×10^6 клеток помещали в колбу T-25 совместно с 12 мл свежей среды и обрабатывали 1 мкМ соединением А и инкубировали

при 37°C и 5% CO₂ в течение 30 мин.

К полученной выше клеточной смеси добавляли H₂O₂ в конечной концентрации 200 мкМ и инкубировали в течение 2 ч.

Собирали сгустки клеток и повторно суспендировали в бессывороточной среде и высевали в 96-луночный планшет в количестве 0,15×10⁶ клеток на лунку в 100 мкл.

Добавляли 50 мкл дексаметазона (Dex) в 3X желаемой концентрации и инкубировали в течение 45 мин.

Добавляли 50 мкл ФНО-α в 4X концентрации таким образом, конечная концентрация составляла 10 нг/мл для индуцирования IL-8, и инкубировали в течение 18 ч.

Собирали надосадочную жидкость и оценивали уровень IL-8 при помощи ELISA.

Исследование цитокинов.

Выделенные стрипы IL-8 помещали в планшеты совместно со свежеприготовленной или размороженной надосадочной жидкостью и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч или ночи при 4°C.

Содержимое отбрасывали и 5 раз промывали стрипы 200 мкл промывочного буфера на лунку в течение 15 с.

Проводили блоттинг стрипов после сушки и добавляли 100 мкл на лунку 1X детектирующего анти-тела и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч.

Содержимое отбрасывали и 5 раз промывали стрипы 200 мкл промывочного буфера на лунку в течение 15 с.

Проводили блоттинг стрипов после сушки и добавляли 100 мкл на лунку 1X антитела авидин-HRP и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин.

Содержимое отбрасывали и 5 раз промывали стрипы 200 мкл промывочного буфера на лунку в течение 15 с.

Добавляли 100 мкл на лунку субстрата TMB и инкубировали при комнатной температуре в течение 5-15 мин.

Реакцию останавливали путем добавления 50 мкл 2н. H₂SO₄ на лунку. Поглощение анализировали на планшет-ридере при 450 и 570 нм.

Результаты.

Как изображено на фиг. 1B, соединение А (соед. А) снижало IC₅₀ дексаметазона (Dex) в отношении концентрации IL-8 в клетках U937, обработанных H₂O₂, что указывает на значительное увеличение активности дексаметазона.

Пример 3. Хроническая инфильтрация клеток, индуцированная сигаретным дымом, у самцов мышей Balb/c.

Животных оставляли для акклиматизации на семь дней перед началом эксперимента. Животных случайным образом распределяли по различным группам в зависимости от массы тела. Мышей подвергали воздействию вдыхаемого дыма 2 сигарет от 1 до 11 дней. Продолжительность воздействия дыма каждой сигареты составляла 10 мин (каждую сигарету полностью сжигали в течение первых 2 мин, затем нагнетали поток воздуха при помощи вентилятора для исследования животных), в последующие 20 мин проводили воздействие свежим комнатным воздухом. После каждого использования двух сигарет делали дополнительный 20-минутный перерыв, в котором проводили воздействие свежим комнатным воздухом. Контрольных животных помещали в камеру с комнатным воздухом. Исследуемое соединение вводили интраназально в виде суспензии от 12 до 14 дней за 30 мин перед воздействием дыма на организм. Мышей подвергали воздействию вдыхаемого дыма 1 сигареты от 12 до 14 дней. На 15 день через 24 ч после последнего воздействия сигаретного дыма (CS) животным спускали кровь под анестезией, канюлировали трахею и промывали легкие 0,5 мл аликвотами гепаринизированного ФБР (1 единица/мл) четыре раза через трахеальную канюлю (общий объем 2 мл). Собранный бронхоальвеолярный лаваж (BAL) хранили при 2-8°C до проведения исследования общего количества клеток и дифференцированного подсчета лейкоцитов. Жидкость BAL центрифугировали (500×g в течение 10 мин) и полученный сгусток клеток повторно суспендировали в 0,5 мл гепаринизированного солевого раствора. Определяли общее количество белых кровяных клеток в жидкости BAL и крови с использованием счетчика кровяных клеток и доводили до 1×10⁶ клеток/мл. Дифференцированный подсчет клеток проводили вручную. 40 мкл клеточной суспензии центрифугировали с использованием Cytospin 3 для получения клеточного отпечатка. Клеточный отпечаток окрашивали раствором для окрашивания крови, позволяющего различать клетки, и изучали под микроскопом, выявляя каждую клетку в соответствии с ее морфологическими характеристиками. Определяли количество клеток каждого типа среди 300 белых кровяных телец в клеточном отпечатке и выражали это количество в процентах и вычисляли количество нейтрофилов и макрофагов в каждом образце жидкости BAL. Кроме того, проводили анализ различных цитокинов в надосадочной жидкости BAL при помощи исследования ELISA.

Результаты показаны в табл. 1 и на фиг. 2A и 2B.

Все животные выживали до запланированного прекращения исследования. Для соединения А было

показано значительное благоприятное терапевтическое действие в достоверной модели хронической ХОБЛ у мышей, что было определено путем оценки количества клеток в BAL. Инфильтрация макрофагов в жидкости BAL у животных, которым проводили лечение, значительно отличалась от контрольных опытов, при этом наблюдали значительное зависящее от дозы снижение (изменение к нормальному состоянию) количества клеток в BAL у мышей, которым вводили соединение А (0,003-3 мг/кг). Количество макрофагов значительно снижалось и приходило в норму у мышей, которым вводили 0,003-3 мг/кг соединения А. Значения ингибирования цитокинов в процентах приведены в табл. 1.

Таблица 1

	Цитокины в BALF (ингибирование, %)		
Доза (мг/кг)	0,003	0,03	0,3
IL-6	11%	44%	99%
ФНО α	17%	40%	99%
IL-12/IL-23	0%	0%	100%
IFN γ	0%	25%	90%

Пример 4. Обращение вспять невосприимчивости к кортикостероиду в исследовании хронической инфильтрации клеток, индуцированной сигаретным дымом, у самцов мышей Balb/c.

Животных оставляли для акклиматизации на семь дней перед началом эксперимента. Животных случайным образом распределяли по различным группам в зависимости от массы тела. Мышей подвергали воздействию вдыхаемого дыма двух сигарет от 1 до 11 дней. Продолжительность воздействия дыма каждой сигареты составляла 10 мин (каждую сигарету полностью сжигали в течение первых 2 мин, затем нагнетали поток воздуха при помощи вентилятора для исследования животных), в последующие 20 мин проводили воздействие свежим комнатным воздухом. После каждого использования двух сигарет делали дополнительный 20-минутный перерыв, в котором проводили воздействие свежим комнатным воздухом. Контрольных животных помещали в камеру с комнатным воздухом. Кортикостероид флутиказон вводили интраназально от 6 до 11 дней за 30 мин перед воздействием дыма на организм. Мышей подвергали воздействию вдыхаемого дыма одной сигареты от 12 до 14 дней. Исследуемое соединение вводили интраназально в виде суспензии от 12 до 14 дней за 30 мин перед воздействием дыма на организм. На 15 день через 24 ч после последнего воздействия сигаретного дыма (CS) животным спускали кровь под анестезией, канюлировали трахею и промывали легкие 0,5 мл аликвотами гепаринизированного ФБР (1 единица/мл) четыре раза через трахеальную канюлю (общий объем 2 мл). Собранный бронхоальвеолярный лаваж (BAL) хранили при 2-8°C до проведения исследования общего количества клеток и дифференцированного подсчета лейкоцитов. Жидкость BAL центрифугировали (500×g в течение 10 мин) и полученный сгусток клеток повторно суспендировали в 0,5 мл гепаринизированного солевого раствора. Определяли общее количество белых кровяных клеток в жидкости BAL и крови с использованием счетчика кровяных клеток и доводили до 1×10^6 клеток/мл. Дифференцированный подсчет клеток проводили вручную. Сорок микролитров клеточной суспензии центрифугировали с использованием Cytospin 3 для получения клеточного отпечатка. Клеточный отпечаток окрашивали раствором для окрашивания крови, позволяющего различать клетки, и изучали под микроскопом, выявляя каждую клетку в соответствии с ее морфологическими характеристиками. Определяли количество клеток каждого типа среди 300 белых кровяных телец в клеточном отпечатке и выражали это количество в процентах, вычисляли количество нейтрофилов и макрофагов в каждом образце жидкости BAL. Кроме того, проводили анализ различных цитокинов в надосадочной жидкости BAL при помощи исследования ELISA.

Для комбинации флутиказона (FLT) и соединения А при помощи синергического действия в отношении инфильтрации макрофагов было показано значительное благоприятное терапевтическое действие и обращение вспять невосприимчивости к кортикостероиду. Значение ED₅₀ комбинации составляло 0,021 мг/кг в достоверной модели хронической ХОБЛ у мышей, что было определено путем оценки количества клеток в BAL, для сравнения ED₅₀ для соединения А, применяемого отдельно, составляла 0,093 мг/кг. Результаты также показаны на фиг. 3А и 3В.

Пример 5. Общее описание идентификации пациентов, выделения нейтрофилов и препарата экстракта сигаретного дыма (CSE) для исследования соединения А in vitro.

А. Отбор пациентов.

В эксперименты по исследованию лейкоцитов были включены здоровые субъекты и пациенты с ХОБЛ. В течение нескольких дней перед включением в выборку проводили тестирование функции легких (форсированная спирометрия) и измерение уровня газа в артериальной крови. В соответствии с результатами спирометрии и наличием привычки к курению пациентов разделяли на две группы:

А) здоровые субъекты, пациенты с нормальной функцией легких, которые не курили;

В) пациенты с ХОБЛ, которые выкуривали более 10 пачек в год, у которых обструкция дыхательных путей была подтверждена объемом форсированного выдоха за 1 с (ОФВ1), который составлял <80%

от ожидаемого значения, и отношением ОФВ1 к форсированной жизненной емкости легких (ВЖЕЛ), которое составляло <70%.

Клинические характеристики пациентов приведены в табл. 2.

Таблица 2

Клинические признаки		
Возраст, лет	66,1 ± 6	65,1 ± 14
Пол (М/Ж)	5/2	6/2
Употребление табака, пачки-год	0	35,2±6
ОФВ1, % от ожид.	98 ± 3	58,2 ± 3
ФЖЕЛ, % от ожид.	96 ± 4	90,2 ± 6
ОФВ1/ФЖЕЛ, %	98 ± 3	59,1 ± 6
Пациенты GOLD 1 (легкая стадия), кол-во	0	0
Пациенты GOLD 2 (умеренная стадия), кол-во	0	8
Пациенты GOLD 3 (тяжелая стадия), кол-во	0	0
Пациенты GOLD 4 (очень тяжелая стадия), кол-во	0	0
Введение ингалируемых стероидов, кол-во	0	3
Введение теофиллинов, кол-во	0	0
Введение b2-агониста длительного действия, кол-во	0	6
Введение антихолинэргетиков, кол-во	0	7

ХОБЛ: хроническая обструктивная болезнь легких;

ОФВ1: объем форсированного выдоха за одну секунду;

ФЖЕЛ: форсированная жизненная емкость легких;

пачка-год = выкуривание 20 сигарет в день в течение 1 года.

Данные приведены в виде среднее ± СКО.

Нейтрофилы и моноциты периферической крови, а также цельную кровь собирали у 8 пациентов с ХОБЛ, которые были выявлены при помощи рекомендаций GOLD, и у 7 здоровых субъектов. Возраст пациентов составлял 65,1±14 лет, ожидаемый ОФВ1 составлял 58,2±3%. Все пациенты являлись действующими курильщиками. Обострения заболевания в течение 2 недель перед отбором образцов крови отсутствовали.

Соответственно, в качестве контроля нормы отбирали 7 соответствующих по возрасту некурящих контрольных субъектов с нормальной функцией легких (возраст 66,1±6 лет, ожидаемый ОФВ1 98±3%), у которых отсутствовали какие-либо респираторные заболевания. Проводили традиционное тестирование функции легких для оценки форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ), объема форсированного выдоха за 1 с (ОФВ1) и отношения ОФВ1/ФЖЕЛ при помощи спирометра Vitalograph® Alpha III (Vitalograph, Maids Moreton, UK). Настоящий проект был одобрен местным комитетом по этике больницы общего профиля Университета Валенсии, Валенсия, Испания, у каждого пациента или добровольца получали письменное информированное согласие перед началом отбора проб крови и тестирования функции легких.

В. Выделение нейтрофилов человека.

Нейтрофилы выделяли из периферической венозной крови при помощи стандартных лабораторных процедур. Вкратце, образцы периферической венозной крови смешивали с 3% декстраном 500 (в 0,9% солевом растворе) в отношении 2:1. Полученную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин до осаждения эритроцитов. Осторожно собирали верхнюю фазу и добавляли с градиентом плотности в Ficoll-Paque Histopaque 1077 (Amershan Pharmacia Biotech, Barcelona, España) в отношении 3:1. Две полученные фазы центрифугировали при 150×g, 4°C в течение 30 мин. Таким образом, полученный сгусток (который состоял из смеси нейтрофилов и небольшого количества остаточных эритроцитов и следов эозинофилов и базофилов) повторно суспендировали в буфере для лизиса эритроцитов (Biolegend, UK) в течение 5 мин во льду. Клеточную суспензию два раза промывали фосфатным буфером (ФБР). Препараты нейтрофилов имели чистоту >97%, что определяли при помощи окрашивания Giemsa, и жизнеспособность >99%, измеренную по исключению трипанового синего. Различия экспериментальных условий исследования не влияли на чистоту и жизнеспособность.

С. Получение растворов экстракта сигаретного дыма.

CSE получали следующим образом: Вкратце, дым исследуемой сигареты (2R4F; Tobacco Health Research, University of Kentucky, KY, USA) получали с использованием насоса для имитации дыхания

(Apparatus Rodent Respirator 680; Harvard, Germany) при помощи механизма выдоха, родственного профилю курящего человека (3 выдоха/мин; 1 выдох 35 мл; каждый выдох имел продолжительность 2 с, составляли 0,5 см сигареты выше фильтра) и нагнетали в колбу, содержащую 25 мл предварительно нагретой (37°C) питательной среды Мемориального института Розуэлл Парка (RPMI)-1640. Раствор CSE стерилизовали путем фильтрования через 0,22 мкм систему стерилизации на основе ацетата целлюлозы (Corning, NY). Полученный раствор CSE принимали за 100% CSE и использовали для целей экспериментов в течение 30 мин после получения. 10% CSE примерно соответствует воздействию от выкуривания двух пачек в день. Качество приготовленного раствора CSE оценивали на основании поглощения при 320 нм, что соответствует специфической длине волны поглощения пероксинитрита. Использовали точные растворы со значением поглощения $3,0 \pm 0,1$. Для исследования цитотоксичности CSE выделенные нейтрофилы обрабатывали CSE в концентрации до 5% в течение 24 ч. По сравнению с контрольной группой значительных различий в уровне лактат-дегидрогеназы в надосадочной жидкости (исследование цитотоксичности лактат-дегидрогеназы; Sauman, Spain) не наблюдали (данные не показаны).

Пример 6.

Исследование: Действие соединения А, дексаметазона и их комбинации в отношении секреции маркера воспаления IL-8, индуцируемой CSE в нейтрофилах периферической крови, у здоровых не курящих субъектов и курящих пациентов с ХОБЛ.

Нейтрофилы человека, выделенные у здоровых добровольцев и пациентов с ХОБЛ, инкубировали совместно с соединением А (0,01 нМ - 100 мкМ) и дексаметазоном (0,1 нМ - 1 мкМ) или носителем в течение 30 мин, после чего инкубировали совместно с 5% CSE или без него в течение 6 ч в стандартных условиях обработки клеточных культур (37°C и 5% CO₂). Собирали надосадочные жидкости для измерения уровня различных маркеров воспаления.

Измеряли уровень IL-8 при помощи ELISA с использованием коммерчески доступного набора.

Эксперименты проводили в трех повторностях, для каждого экспериментального условия исследовали примерно трех пациентов.

Нейтрофилы, выделенные у здоровых субъектов и пациентов с ХОБЛ, стимулировали 5% CSE в присутствии соединения А (0,01 нМ - 100 мкМ) или дексаметазона (DEX; 0,1 нМ - 1 мкМ) в течение 6 ч и измеряли уровень IL-8 в надосадочных жидкостях. Кривые зависимости ингибирования от концентрации показаны на фиг. 4 и в табл. 3.

Таблица 3. Ингибирование высвобождения IL-8 в выделенных нейтрофилах периферической крови у здоровых субъектов (N=3) и пациентов с ХОБЛ (N=3). Кривые зависимости ингибирования от концентрации получали для инкубации совместно с соединением А (соед. А; 0,01 нМ - 100 мкМ) или дексаметазоном (DEX; 0,1 нМ - 1 мкМ) в ответ на экстракт сигаретного дыма (CSE 5%). Значения приведены как среднее $\pm$ СОС для трех независимых экспериментов, которые проводили в трех повторностях. Значения IC₅₀ для полумаксимального ингибирования вычисляли при помощи анализа нелинейной регрессии. * $p < 0,05$ по сравнению со значениями для здоровых субъектов.

Таблица 3

Стимул	ЗДОРОВЫЕ			ХОБЛ		
	Максимальное ингибирование, %	-log IC ₅₀	N	Максимальное ингибирование, %	-log IC ₅₀	N
Соед.А	97,4 $\pm$ 5,3	6,53 $\pm$ 0,22	3	85,14 $\pm$ 8,24	7,32 $\pm$ 0,21	3
DEX	83,9 $\pm$ 10,7	7,85 $\pm$ 0,17	3	19,84 $\pm$ 11,46*	7,87 $\pm$ 0,78	3

При добавлении дексаметазона в фиксированной концентрации 1 нМ к соединению А в увеличивающихся концентрациях, составляющих 0,1, 1 и 10 нМ, наблюдали более активное ингибирование индуцированного CSE высвобождения IL-8 нейтрофилами у пациентов с ХОБЛ (фиг. 5).

Соединение А зависящим от концентрации образом подавляли секрецию IL-8 нейтрофилами у здоровых субъектов и пациентов с ХОБЛ, где максимальное ингибирование в процентах составляло 97,4 $\pm$ 5,3% и 85,14 $\pm$ 8,24% соответственно. Для сравнения противовоспалительный агент дексаметазон имел благоприятный профиль ингибирования в отношении индуцированного CSE высвобождения IL-8 в нейтрофилах у здоровых субъектов, где максимальное ингибирование в процентах составляло 83,9 $\pm$ 10%. Тем не менее дексаметазон был не способен в значительной степени ингибировать высвобождение IL-8 в нейтрофилах у пациентов с ХОБЛ, что подтверждает профиль невосприимчивости к кортикостероиду.

Пример 7.

Исследование: Действие соединения А в отношении базальной экспрессии РНК в медиаторах устойчивости к кортикостероиду и изоформах Р1ЗК с применением нейтрофилов периферической крови у здоровых некурящих субъектов и курящих пациентов с ХОБЛ.

Измерение базальной экспрессии РНК в медиаторах устойчивости к кортикостероиду: Тотальную РНК выделяли из нейтрофилов периферической крови у пациентов с ХОБЛ в условиях на исходном уровне и после проведения эксперимента. Гомогенизировали клетки и экстрагировали РНК с использо-

ванием реагента для выделения TriPure® Isolation Reagent (Roche, Indianapolis, USA). Проводили обратную транскрипцию 300 нг тотальной РНК с использованием набора реагентов для обратной транскрипции TaqMan (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation, CA, USA). 1,5 мкл полученной кДНК амплифицировали с использованием специфических предварительно разработанных праймеров (Applied Biosystems) к MIF (кат. № Hs00236988), MKP-1 (кат. № Hs00610256), PI3K δ (кат. № 00192399), PI3K γ (кат. № Hs00277090) и GAPHD (кат. № 4310884E) в качестве эндогенного контроля в системе быстрой ПНР в реальном времени 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem) с использованием Universal Master Mix (Applied Biosystems). Проводили относительную количественную оценку указанных различных транскриптов при помощи способа $2^{-\Delta\Delta Ct}$ и нормировали по показателям, полученным в контрольных группах.

Экспрессию мРНК в генах MIF, MKP-1, PI3K δ и PI3K γ измеряли в условиях на исходном уровне и после завершения экспериментов.

Эксперименты проводили в трех повторностях, для каждого экспериментального условия исследовали по меньшей мере трех пациентов.

Результаты: Воздействие CSE или соединения А в значительной степени не влияло на экспрессию MIF. В противоположность этому, CSE снижал экспрессию MKP-1 до значения, составлявшего примерно 0,4 от контрольного. Соединение А повышало экспрессию MKP-1 примерно до контрольного уровня, что хорошо коррелирует с ингибирующим действием соединения А в отношении высвобождения IL-8. См. фиг. 6. Обработка CSE не влияла на PI3K δ , при этом введение соединения А приводило к значительному снижению индуцированной CSE экспрессии PI3K γ (фиг. 7).

Пример 8.

Исследование: Действие соединения А, дексаметазона и их комбинации в отношении базальной экспрессии изоформ PI3K с применением нейтрофилов периферической крови у здоровых некурящих субъектов и курящих пациентов с ХОБЛ.

Измерение изоформ PI3K: Для измерения активности PI3K выделяли нейтрофилы у пациентов с ХОБЛ и инкубировали совместно с соединением А в концентрации 10 нМ в течение 1 ч. Клетки стимулировали 5% CSE в течение 30 мин. После стимуляции клеток центрифугировали нейтрофилы и экстрагировали общий белок из нейтрофилов. Количество общего белка измеряли при помощи исследования Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories Ltd., Herts, UK) для подтверждения получения равных количеств. Активность PI3K измеряли с использованием ELISA для активности PI3-киназы: Pico (кат. № k-1000s, Echelon Bioscience, Salt Lake City, USA) согласно протоколу, изданному производителем. Вкратце, проводили реакции PI3K с использованием физиологического субстрата PI3K I класса PI(4,5)P2 (PIP2). Затем смешивали ферментные реакционные смеси, стандарты PIP3 и контрольные образцы и инкубировали совместно с белком, связывающим PIP3, который обладает высокой специфичностью и чувствительностью к PIP3. Затем смесь переносили в микропланшет с покрытием PIP3 для конкурентного связывания. После этого для детектирования количества PIP3, получаемого под действием PI3-K, использовали связанный с пероксидазой вторичный детектор и способ колориметрического детектирования и сравнивали показатели для ферментных реакций со стандартной кривой PIP3.

Эксперименты проводили в трех повторностях, для каждого экспериментального условия исследовали по меньшей мере трех пациентов.

Результаты: В нейтрофилах пациентов с ХОБЛ 5% CSE повышал активность PI3K, определенную при измерении выработки PIP3. Добавление 10 нМ соединения А полностью подавляло активность PI3K (фиг. 8).

Несмотря на то, что настоящее изобретение было описано при помощи конкретных вариантов реализации, следует понимать, что указанные варианты реализации приведены исключительно для иллюстрации основ и способов применения настоящего изобретения. Таким образом, следует понимать, что можно проводить многочисленные модификации иллюстративных вариантов реализации и можно предложить другие конфигурации, не выходя за рамки сущности и объема настоящего изобретения, описанного выше. Подразумевается, что прилагаемая формула изобретения определяет объем настоящего изобретения и охватывает способы и структуры и их эквиваленты, включенные в объем настоящей формулы изобретения.

Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в том же объеме, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были бы указаны конкретно и отдельно для включения в настоящее описание посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения респираторного заболевания или состояния, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества (i) двойного ингибитора PI3K дельта и гамма и (ii) кортикостероида,

где указанный двойной ингибитор PI3K дельта и гамма представляет собой соединение формулы А

CC(C)Oc1ccc(F)cc1-c2nc3c(ncn3C4=CC=CC=C4F)C(=O)c5cc(F)ccc5O2

- 16 -

или его фармацевтически приемлемую соль, и
указанный кортикостероид выбран из флутиказона, флутиказона пропионата, дексаметазона и мометазона фуората; и

где фармацевтическая композиция содержит от 0,001 до 1000 мг двойного ингибитора Р1ЗК дельта и гамма и от 0,010 до 250 мг кортикостероида.

14. Фармацевтическая композиция по п.13, отличающаяся тем, что указанный кортикостероид представляет собой флутиказон.

15. Фармацевтическая композиция по п.13, отличающаяся тем, что указанный кортикостероид представляет собой флутиказона пропионат.

16. Фармацевтическая композиция по п.13, отличающаяся тем, что указанный кортикостероид представляет собой мометазона фуорат.

17. Фармацевтическая композиция по любому из пп.13-16, отличающаяся тем, что указанная композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель, глидант, разбавитель или вспомогательное вещество.

18. Фармацевтическая композиция по любому из пп.13-17, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит от 0,030 до 125 мг двойного ингибитора Р1ЗК дельта и гамма и от 0,030 до 50 мг кортикостероида.

19. Фармацевтическая композиция по любому из пп.13-18 для применения в способе лечения респираторного заболевания или состояния, выбранного из группы, состоящей из астмы, хронической обструктивной болезни легких, аллергического ринита, неаллергического ринита, фиброза легких, кистозного фиброза, идиопатического фиброза легких (ИФЛ) и их комбинаций.

20. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.13-19 для получения лекарственного средства для лечения респираторного заболевания или состояния, выбранного из группы, состоящей из астмы, хронической обструктивной болезни легких, аллергического ринита, неаллергического ринита, фиброза легких, кистозного фиброза, идиопатического фиброза легких (ИФЛ) и их комбинаций.

21. Набор для лечения респираторного заболевания или состояния, содержащий:

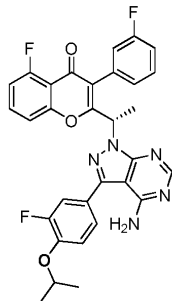
(i) двойной ингибитор Р1ЗК дельта и гамма;

(ii) кортикостероид

или их фармацевтически приемлемые соли,

в составе одной фармацевтической композиции или отдельных фармацевтических композиций,

где указанный двойной ингибитор Р1ЗК дельта и гамма представляет собой соединение формулы А



Формула А

или его фармацевтически приемлемую соль, и
указанный кортикостероид выбран из флутиказона, флутиказона пропионата, дексаметазона и мометазона фуората;

(iii) инструкции по лечению респираторного заболевания или состояния с применением двойного ингибитора Р1ЗК дельта и гамма и кортикостероида;

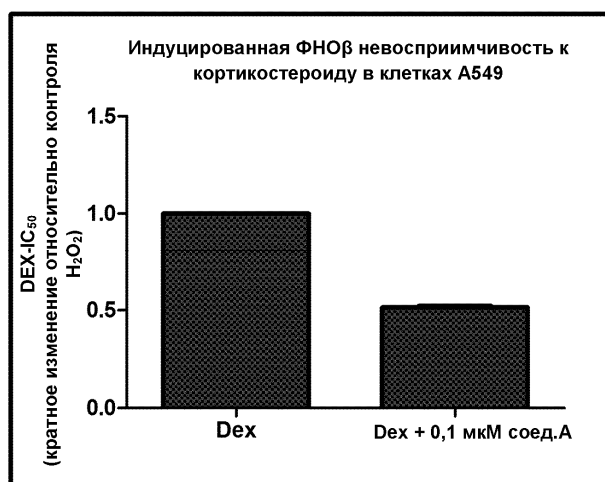
(iv) контейнер для фармацевтической композиции или фармацевтических композиций.

22. Набор по п.21, отличающийся тем, что указанное респираторное заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из астмы, хронической обструктивной болезни легких, аллергического ринита, неаллергического ринита, фиброза легких, кистозного фиброза и идиопатического фиброза легких (ИФЛ).

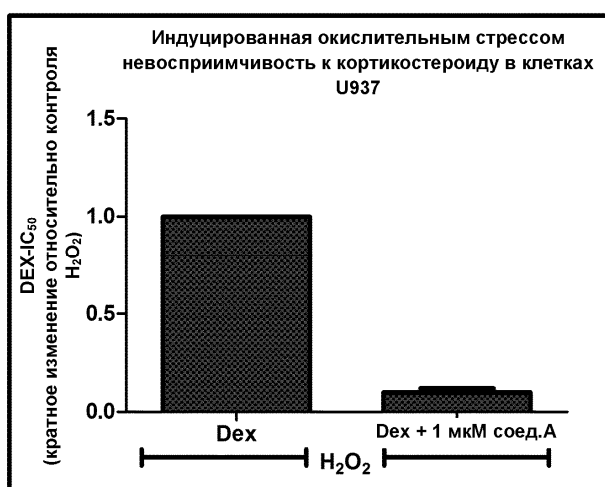
23. Набор по п.21, отличающийся тем, что указанный кортикостероид представляет собой флутиказон.

24. Набор по п.21, отличающийся тем, что указанный кортикостероид представляет собой флутиказона пропионат.

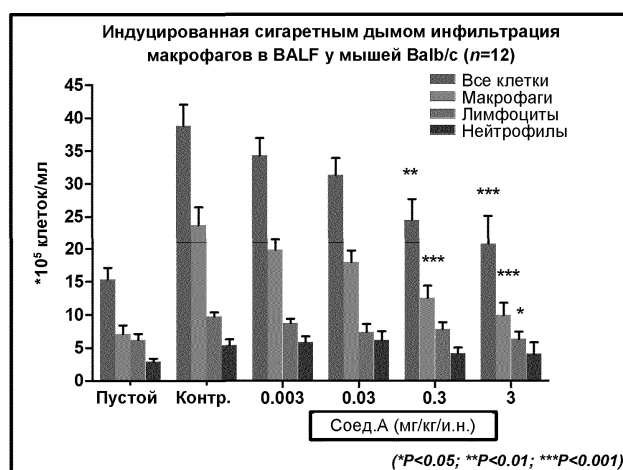
25. Набор по п.21, отличающийся тем, что указанный кортикостероид представляет собой мометазона фуорат.



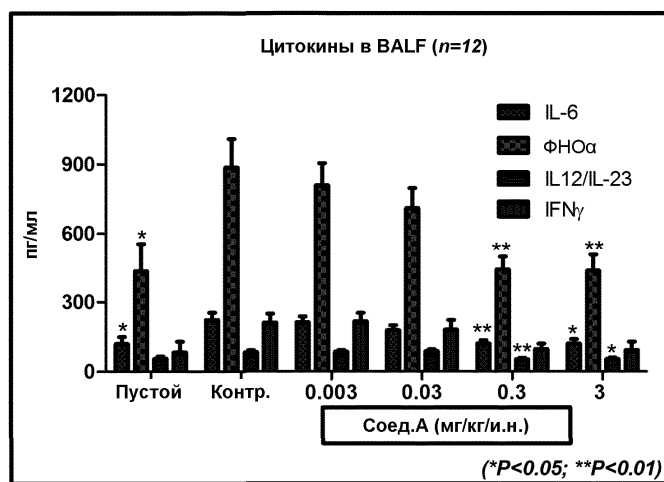
Фиг. 1А



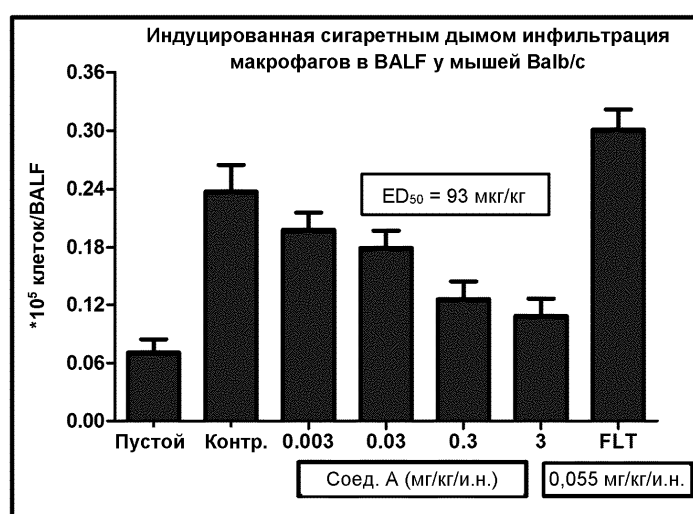
Фиг. 1В



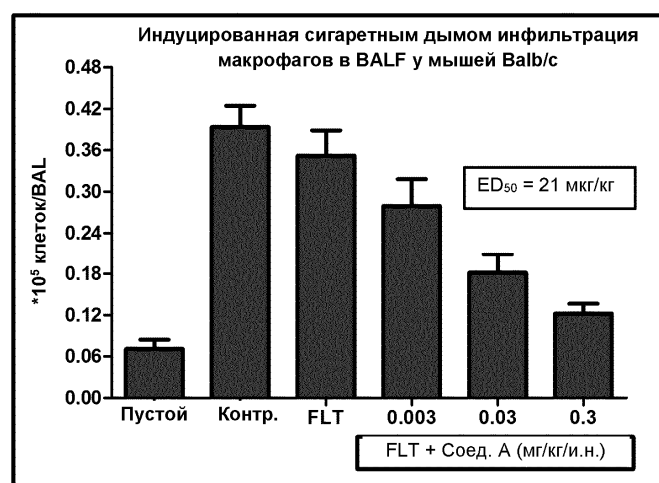
Фиг. 2А



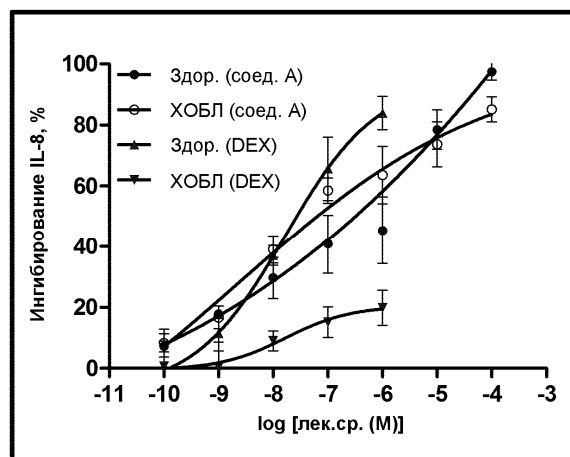
Фиг. 2В



Фиг. 3А

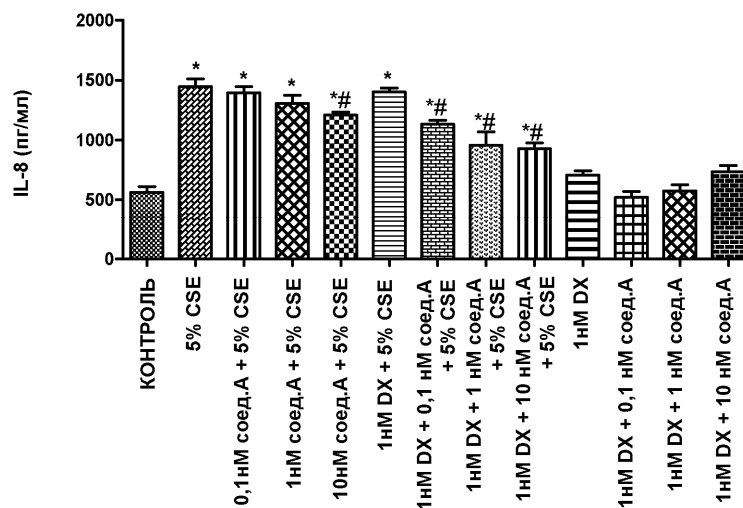


Фиг. 3В

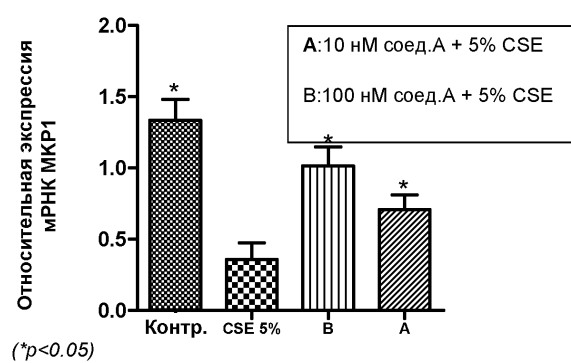


Фиг. 4

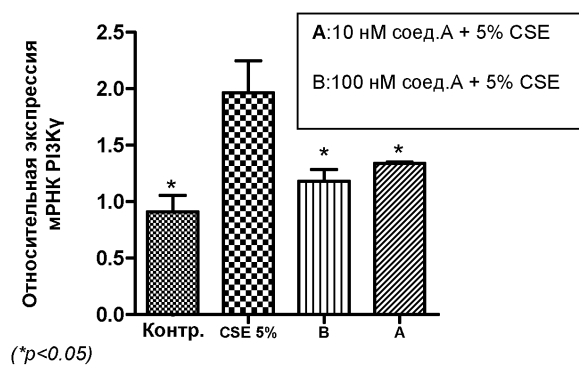
Действие соединения (соед.А) и дексаметазона (DX) в нейтрофилах, выделенных у пациентов с ХОБЛ



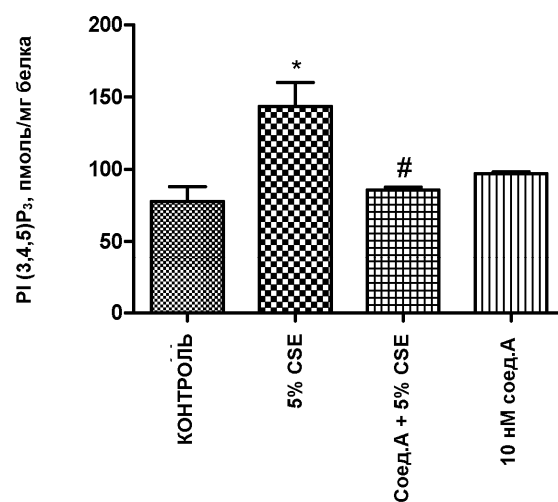
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

