

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290359 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.05.30(22) Дата подачи заявки
2020.07.17

(51) Int. Cl. A61K 31/4184 (2006.01)
A61K 31/4427 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)

(54) ИНГИБИТОРЫ ФЕРРОПОРТИНА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ
ТРАНСФУЗИОННО-ЗАВИСИМОЙ БЕТА-ТАЛАССЕМИИ (TDT)

(31) 19187248.0; 20174230.1

(32) 2019.07.19; 2020.05.12

(33) EP

(86) PCT/EP2020/070391

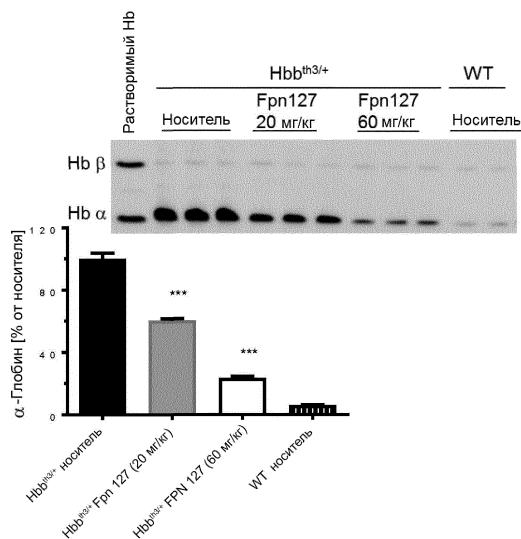
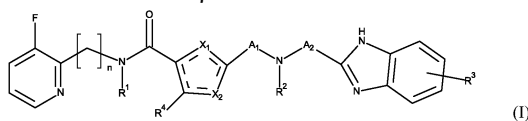
(87) WO 2021/013771 2021.01.28

(71) Заявитель:
ВИФОР (ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ) АГ
(CH)

(72) Изобретатель:
Манолова Ваниа, Ниффенеггер Ная,
Альтерматт Патрик, Дюрренбергер
Франц (CH)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Изобретение относится к применению ингибиторов ферропортина - соединений общей формулы (I), для лечения трансфузионно-зависимой β -талассемии.



A1

202290359

202290359

A1

ИНГИБИТОРЫ ФЕРРОПОРТИНА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ТРАНСФУЗИОННО-ЗАВИСИМОЙ БЕТА-ТАЛАССЕМИИ (TDT)

Введение

Изобретение относится к применению соединений общей формулы (I), которые действуют как ингибиторы ферропортина, для лечения трансфузионно-зависимой β -талассемии (TDT) и симптомов и патологических состояний, связанных с ней.

Предпосылки и уровень техники

Железо является необходимым микроэлементом почти для всех организмов и имеет важное значение, в частности, в отношении роста и образования крови. Баланс обмена железа в этом случае в первую очередь регулируется уровнем извлечения железа из гемоглобина стареющих эритроцитов, из запасов железа в печени и всасывания железа в двенадцатиперстной кишке из пищи. Высвобожденное железо поглощается через кишечник, в частности, с помощью специфических транспортных систем (DMT-1, ферропортин), переносится в кровоток и таким образом доставляется в соответствующие ткани и органы (трансферрин, рецепторы трансферрина). В организме человека элемент железо имеет большое значение, *inter alia*, для переноса кислорода, поглощения кислорода, клеточных функций, таких как митохондриальный перенос электронов, когнитивные функции и т.д., и в конечном счете для всего энергетического метаболизма. Организмы млекопитающих не способны активно выделять железо. Метаболизм железа по существу контролируется гепсидином через клеточное высвобождение железа из макрофагов, гепатоцитов и энтероцитов. Гепсидин действует на всасывание железа через кишечник и через плаценту и на высвобождение железа из ретикулоэндотелиальной системы. Образование гепсидина регулируется в прямой взаимосвязи с уровнем железа в организмах, т.е., если организм снабжается железом и кислородом в достаточной степени, гепсидина образуется больше, если уровни железа и кислорода низкие, или в случае усиленного эритропоэза, гепсидина образуется меньше. В клетках слизистой оболочки тонкого кишечника и в макрофагах гепсидин связывается с транспортным белком ферропортином, который обычно транспортирует железо из внутренней части клетки в кровь. Транспортный белок ферропортин представляет собой трансмембранный белок, состоящий из 571 аминокислоты, который экспрессируется в печени, селезенке, почках, сердце, кишечнике и плаценте. В частности, ферропортин локализуется в базолатеральной мембране клеток кишечного эпителия. Ферропортин локализуется таким образом, что действует на экспорт железа из пищи в кровь. Если гепсидин связывается с ферропортином, ферропортин транспортируется во внутреннюю часть клетки, где

происходит его разрушение, так что затем высвобождение железа из клеток почти полностью блокируется. Если ферропортин инактивируется или ингибируется гепсидином, так что он неспособен к экспорту железа, которое хранится в клетках слизистой оболочки, всасывание железа в кишечнике блокируется. Уменьшение гепсидина приводит к увеличению активного ферропортина, допуская таким образом усиленное высвобождение накопленного железа и усиленное всасывание железа из пищи, увеличивая таким образом уровень железа в сыворотке крови. В патологических случаях увеличенный уровень железа ведет к хронической перегрузке железом.

Например, чрезмерное поглощение железа в органах, таких как печень и сердце, приводит к накоплению железа. Кроме того, накопление железа в головном мозгу наблюдается у пациентов, страдающих от нейродегенеративных заболеваний, таких как, например, болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона. Основная часть циркулирующего железа связана с трансферрином, классической молекулой, транспортирующей железо, которая предотвращает существование свободного железа. Фракции железа, не связанные с трансферрином (или с другими традиционными молекулами, связывающими железо, подобными гему, апоферритину, гемосидерину и т.д.), все вместе относят к железу, не связанному с трансферрином (NTBI). В другом аспекте состояний и заболеваний, связанных с перегрузкой железом, многие проблемы и патологические состояния возникают из-за избыточных уровней свободного железа в плазме и сыворотке, т.е. NTBI.

Отдельным вредным аспектом такого избытка свободного железа является нежелательное образование радикалов. В частности, ионы железа (II) катализируют образование (в частности, через реакцию Фентона) реактивных форм кислорода (ROS). Эти ROS вызывают повреждение ДНК, липидов, белков и углеводов, что имеет далеко идущие последствия для клеток, тканей и органов. Образование ROS хорошо известно и описано в литературе как вызывающее так называемый окислительный стресс. Широко описано, что NTBI проявляет высокую склонность индуцировать такие ROS, обладающие токсическим потенциалом для повреждения клеток, причем токсичность железа влияет на большинство органов, включая сердце, поджелудочную железу, почки и органы, вовлеченные в кроветворение. Соответственно, известно, что перегрузка железом вызывает повреждение ткани и органа, такое как, например, повреждение сердца, печени и эндокринное повреждение (Patel M. et al., "Non Transferrin Bound Iron: Nature, Manifestations and Analytical Approaches for Estimation", *Ind. J. Clin. Biochem.*, 2012; 27(4): 322-332, и Brissot P. et al., Review "Non-transferrin bound iron: A key role in iron overload and iron toxicity", *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012; 1820, 403-410).

Заболевание, связанное с перегрузкой железом, β -талассемия представляет собой

наследственную анемию, вызванную мутациями в гене β -глобина гемоглобина (Hb), приводящими к аномальным красным клеткам крови (RBC) с уменьшенной продолжительностью жизни (Rivella S. *"Iron metabolism under conditions of ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia."* *Blood*, 2019; 133(1), 51-8, и Taher A. T. *"Weatherall D. J. and Cappellini M. D. "Thalassaemia", Lancet*, 2018; 391(10116), 155-67). У здоровых субъектов Hb состоит из цепей α - и β -глобина, которые вместе с содержащими железо гемовыми группами образуют в RBC функциональные гетеротетрамеры $\alpha_2\beta_2$ для эффективной доставки кислорода в ткани. Основным патофизиологический механизм β -талассемии является результатом сниженного синтеза цепей β -глобина, вызывающего накопление неспаренных агрегатов α -глобина на мембранах RBC. Выпавшие в осадок агрегаты α -глобина содержат гем и железо, которые генерируют ROS, приводя к сокращенной продолжительности жизни RBC, анемии и гипоксии тканей (Mettananda S., Gibbons R. J., and Higgs D.R. *"alpha-Globin as a molecular target in the treatment of beta-thalassemia."* *Blood*, 2015; 125(24), 3694-701, и Rivella S. *"beta-thalassemias: paradigmatic diseases for scientific discoveries and development of innovative therapies."* *Haematologica*, 2015; 100(4), 418-30). В качестве компенсаторного ответа на сокращенную продолжительность жизни RBC у пациентов с β -талассемией существенно стимулируется эритропоэз, что приводит к усиленной пролиферации и сниженной дифференцировке эритроидных предшественников (неэффективный эритропоэз) в костном мозге (BM) и экстрамедуллярных сайтах, таких как селезенка и печень (Rivella S. *"The role of ineffective erythropoiesis in non-transfusion-dependent thalassemia."* *Blood Rev.*, 2012; 26 Suppl 1, S12-5). Неэффективный эритропоэз при β -талассемии вызывает избыточное поглощение железа для поддержания повышенной потребности в железе для синтеза Hb и ведет к повышенным концентрациям железа в плазме и в конечном счете к перегрузке органов железом. Печень, селезенка, сердце и поджелудочная железа являются тканями, которые обычно поражаются при перегрузке железом, и без терапевтического вмешательства перегрузка железом может привести к повреждению органов, такому как цирроз печени, сердечная недостаточность и диабет.

Неэффективный эритропоэз при β -талассемии вызывает избыточное поглощение железа из-за компенсаторной реакции обратной связи на гипоксию, которая подавляет гепсидин (Kattamis A., Papassotiriou I., Palaiologou D., Apostolakou F., Galani A., Ladis V., Sakellaropoulos N., and Papanikolaou G. *"The effects of erythropoietic activity and iron burden on hepcidin expression in patients with thalassemia major."* *Haematologica*, 2006; 91(6), 809-12). Так как аномально высокие уровни железа, которые являются результатом подавления гепсидина, также стимулируют эритропоэз, анемия и перегрузка железом

усугубляются в порочном замкнутом круге. Важную роль в связывании эритропоэза и поглощения железа играет HIF2 α , так как HIF2 α стимулирует как синтез эритропоэтина (EPO), так и продуцирование транспортера двухвалентного металла 1 (DMT1), дуоденального цитохрома В (DCytB) и ферропортина (Anderson S. A., Nizzi C. P., Chang Y. I., Deck K. M., Schmidt P. J., Galy B., Damnernsawad A., Broman A. T., Kendzioriski C., Hentze M. W., et al. "The IRP1-HIF-2 α axis coordinates iron and oxygen sensing with erythropoiesis and iron absorption." *Cell Metab*, 2013; 17(2), 282-90, и Schwartz A. J., Das N. K., Ramakrishnan S. K., Jain C., Jurkovic M. T., Wu J., Nemeth E., Lakhal-Littleton S., Colacino J. A., and Shah Y. M. "Hepatic hepcidin/intestinal HIF-2 α axis maintains iron absorption during iron deficiency and overload." *J. Clin. Invest.*, 2019; 129(1), 336-48). EPO стимулирует пролиферацию эритробластов и индуцирует продуцирование эритроидного фактора эритроферрона (ERFE), который в свою очередь подавляет гепсидин (Kautz L., Jung G., Valore E. V., Rivella S., Nemeth E., and Ganz T. "Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism." *Nat Genet*, 2014). Поэтому коррекция несбалансированного поглощения железа путем индукции синтеза гепсидина или добавления миметиков гепсидина рассматривается как привлекательный терапевтический подход для нормализации нарушенного метаболизма железа при β -талассемии.

Экспериментальные лекарственные средства, такие как укороченные пептиды, полученные из гепсидина, содержащие неприродные аминокислоты (минигепсидины) или олигонуклеотиды, которые усиливают синтез эндогенного гепсидина путем ингибирования экспрессии *Tmprss6*, как показано, корректируют анемию и уменьшают перегрузку железом на мышинной модели *Hbb th3/+* трансфузионно независимой промежуточной β -талассемии (Casu C., Oikonomidou P. R., Chen H., Nandi V., Ginzburg Y., Prasad P., Fleming R. E., Shah Y. M., Valore E. V., Nemeth E., et al. "Minihepcidin peptides as disease modifiers in mice affected by β -thalassemia and polycythemia vera." *Blood*, 2016; 128(2), 265-76, и Schmidt P. J., Toudjarska I., Sendamarai A. K., Racie T., Milstein S., Bettencourt B. R., Hettinger J., Bumcrot D., and Fleming M. D. "An RNAi therapeutic targeting *Tmprss6* decreases iron overload in *Hfe(-/-)* mice and ameliorates anemia and iron overload in murine beta-thalassemia intermedia." *Blood*, 2013; 121(7), 1200-8, и Guo S., Casu C., Gardenghi S., Booten S., Aghajan M., Peralta R., Watt A., Freier S., Monia B. P., and Rivella S. "Reducing *TMPRSS6* ameliorates hemochromatosis and beta-thalassemia in mice." *J. Clin. Invest.*, 2013; 123(4), 1531-41). Введение пептидов миметиков гепсидина мыши *th3/+* - модели трансфузионно независимой β -талассемии привело к ослаблению неэффективного эритропоэза, увеличению времени выживания красных клеток и улучшению при анемии. У этой модели предотвращение перегрузки железом из-за снижения поглощения

пищевого железа оказалось дополнительным преимуществом терапии миметиками гепсидина.

Кроме того, в клинических исследованиях испытывали синтетический человеческий гепсидин (LJPC-401), а также пептидомиметик гепсидина (PTG-300) и антисмысловой олигонуклеотид, нацеливающий на Tmprss6 (IONIS-TMPRSS6-L RX).

Что касается лечения талассемии, то необходимо различать различные формы и фенотипы талассемии. Существует два основных типа талассемии: α -талассемия (альфа-талассемия) и β -талассемия (бета-талассемия), которые поражают различные части молекулы гемоглобина. α -Талассемия вызывается мутациями (делеция гена в хромосоме 16) в генах HBA1 и/или HBA2, которые кодируют альфа-глобин, в то время как β -талассемия вызывается мутациями в гене HBB, кодирующем бета-глобин. У каждого человека имеется две копии каждого из этих генов, одна унаследована от матери и одна от отца. Потеря (делеция) некоторых или всех генов HBA1 и/или HBA2 приводит к нехватке альфа-глобина, что ведет к α -талассемии, а мутации в гене HBB ведут к пониженным уровням бета-глобина, вызывая β -талассемию.

При β -талассемии клинические фенотипы подразделяются на три группы на основании степени, до которой ухудшается продуцирование бета-глобина:

- малая β -талассемия (или признаки),
- промежуточная β -талассемия,
- большая β -талассемия.

Малая β -талассемия (признаки) встречается у гетерозигот (β/β^+ или β/β^0), у которых они обычно протекает бессимптомно с легкой или умеренной микроцитарной анемией. Этот фенотип может также возникать в легких случаях β^+/β^+ . Пациенты, страдающие от малой β -талассемии (признаков), как правило, не требуют лечения. У людей, пораженных малой β -талассемией, может развиться легкая анемия или у них вообще может не быть признаков или симптомов этого состояния.

Промежуточная β -талассемия представляет собой изменчивую клиническую картину, промежуточную между большой или малой талассемией, вызванную наследованием 2 аллелей β -талассемии (β^+/β^0 или тяжелые случаи β^+/β^+). Пациентам, страдающим от легкой-средней промежуточной β -талассемии, могут потребоваться периодические или прерывистые нечастые трансфузии для лечения заболевания и его осложнений.

Большая β -талассемия (или анемия Кули) возникает у гомозигот (β^0/β^0 , β^+/β^+) или тяжелых сложных гетерозигот (β^0/β^+) и является результатом тяжелого дефицита бета-глобина. Большая β -талассемия является наиболее тяжелым типом β -талассемии.

У этих пациентов развивается тяжелая анемия и гиперактивность костного мозга. Большая β -талассемия проявляется в возрасте от 1 до 2 лет с симптомами тяжелой анемии и перегрузки трансфузионным и абсорбционным железом. У пациентов наблюдается желтуха, возникают язвы на ногах и желчнокаменная болезнь. Распространена спленомегалия, часто массивная. Может развиваться секвестрация селезенки, ускоряющая разрушение перелитых нормальных красных клеток крови. Гиперактивность костного мозга вызывает утолщение костей черепа и скуловых возвышений. Поражение длинных костей предрасполагает к патологическим переломам и ухудшает рост, возможно, задерживая или предотвращая половое созревание. При перегрузке железом отложения железа в сердечной мышце могут вызвать сердечную недостаточность. Типичным является сидероз печени, ведущий к функциональным нарушениям и циррозу. Пациенты, страдающие от большой β -талассемии, обязательно требуют регулярных (пожизненных) трансфузий RBC (переливаний крови) для выживания.

Также взаимодействие гемоглобина E (HbE) с различными формами талассемии приводит к широкому спектру клинических расстройств, в то время как его совместное наследование с β -талассемией является состоянием, называемым β -талассемией с гемоглобином E, которое является наиболее распространенной тяжелой формой β -талассемии в Азии и во всем мире составляет приблизительно 50% клинически тяжелых расстройств β -талассемии (*Suthat Fucharoen and David J. Weatherall, "The Hemoglobin E Thalassemias", Cold Spring Harb. Perspect. Med., 2012; 2(8)*). Гемоглобин E (HbE) является чрезвычайно распространенным структурным вариантом гемоглобина, который встречается с высокой частотой во многих азиатских странах. Он является вариантом β -гемоглобина, который продуцируется с несколько сниженной скоростью и, следовательно, имеет фенотип легкой формы β -талассемии. Хотя один лишь HbE не вызывает каких-либо клинических проблем, его взаимодействия с различными формами α - и β -талассемии вызывают весьма широкий спектр клинических синдромов различной тяжести.

Система оценки, основанная на шести независимых параметрах - уровне гемоглобина, возрасте при проявлении заболевания, возрасте при первом переливании крови, потребности в переливании, размере селезенки, росте и развитии, разработана для разделения пациентов на три различные категории по тяжести: легкая, умеренная и тяжелая, с системой оценки, состоящей из шести клинических критериев, оцениваемых как 0, 0,5, 1 или 2, в соответствии с клинической картиной. Пациентов с β -талассемией HbE с общим количеством баллов от 0 до 3,5, от 4 до 7 и от 7,5 до 10, группируют как легкие, умеренные и тяжелые случаи, соответственно. Тяжелые пациенты очень

малокровны и зависят от переливаний крови; некоторые могут иметь заметную задержку роста, в то время как в легких случаях имеется умеренная анемия и обычно имеется нормальный рост и развитие (*Sripichai O. et al., "A scoring system for the classification of β -thalassemia/Hb E disease severity", Am. J. Hematol., 2008; 83: 482–484*).

В 2012 году Международная федерация талассемии приняла новую терминологию для клинической классификации талассемии в своих руководствах, проводя различие между

- трансфузионно независимой β -талассемией (NTDT) и
- трансфузионно-зависимой β -талассемией (TDT).

Такая клиническая классификация талассемии дополнительно описана, например, в *Viprakasit V. et al., "Clinical Classification, Screening and Diagnosis for Thalassemia", Hematol. Oncol. Clin. N. Am., 2018; 32: 193-211*. В этой статье фиг. 1 показывает, что NTDT/TDT являются континуумом, и что как NTDT, так и TDT могут являться результатом HbE/ β -талассемии в зависимости от β -аллельной тяжести.

NTDT включает множество фенотипов, которые, в отличие от пациентов с большой β -талассемией или тяжелыми формами β -талассемии с гемоглобином E, не требуют для выживания регулярной трансфузионной терапии. Наиболее часто исследуемыми формами являются промежуточная β -талассемия, α - и β -талассемия гемоглобина E (легкая и умеренная формы) и промежуточная α -талассемия (болезнь гемоглобина H). Однако независимость от трансфузии у таких пациентов не лишена побочных эффектов. Неэффективный эритропоэз, периферический гемолиз и недостаточное продуцирование гепсидина - отличительные признаки процесса заболевания, могут привести к различным последующим патофизиологиям, включая перегрузку железом и гиперкоагуляцию, которые в конечном итоге ведут к ряду серьезных клинических заболеваний, включая замедление роста, задержку полового созревания, проблемы с костями и/или увеличение селезенки.

TDT, напротив, включает пациентов с большой β -талассемией и тяжелыми формами β -талассемии с гемоглобином E, при которой пациентам для выживания требуются регулярные трансфузии красных клеток крови (RBC). TDT является наиболее тяжелой формой β -талассемии и характеризуется необходимостью регулярных переливаний крови, что неизбежно ведет к вторичной перегрузке железом, которую регулярно лечат с помощью терапии хелаторами железа. Пациенты, страдающие от тяжелых форм β -талассемии, могут также испытывать тяжелую анемию, плохой аппетит, бледность, иметь темную мочу, пожелтение кожи (желтуху) и увеличение печени или сердца. Регулярные переливания крови и терапия хелаторами железа не устраняют

основной патологический механизм заболевания и связаны с повышенным риском инфекции и побочных реакций. Кроме того, регулярные переливания крови представляют собой значительную нагрузку для пациентов и значительно снижают качество их жизни.

Диагностику и клиническую классификацию осуществляют путем клинической оценки, применяя признанные клинические и гематологические параметры.

Перегрузка железом является обычной как при большой талассемии, так и при промежуточной талассемии, но в каждом случае имеет различную этиологию (Musallam KM, et al., “Cross-talk between available guidelines for the management of patients with beta-thalassemia major”. *Acta Haematologica*, 2013; 130(2): 64–73, и Musallam KM, et al., “Iron overload in β -thalassemia intermedia: an emerging concern. *Current Opinion in Hematology*”. 2013; 20(3): 187–192).

Пациенты с большой талассемией регулярно получают трансфузии RBC и без сопровождения терапией хелаторами железа содержание железа от таких трансфузий может сильно повышать уровни циркулирующего и хранящегося железа в организме пациента.

У пациентов с промежуточной талассемией трансфузии не являются основным источником перегрузки железом из-за низкой частоты трансфузий. Однако пациенты с промежуточной талассемией испытывают перегрузку железом из-за повышенной абсорбции железа в кишечнике, в первую очередь из-за низких сывороточных уровней гепсидина, вызванных хронической анемией, неэффективным эритропоэзом и гипоксией тканей.

Патологические эффекты перегрузки железом являются широкими и системными у пациентов как с большой талассемией, так и с промежуточной талассемией, с некоторыми различными и некоторыми пересекающимися клиническими последствиями (Cappellini MD, et al., “Guidelines for the Management of Transfusion Dependent Thalassaemia (TDT)” (3rd edition), 2014, и Taher A. et al., “Guidelines for the Management of Non Transfusion Dependent Thalassaemia (NTDT)”, 2013).

Группы пациентов как с большой талассемией, так и промежуточной талассемией могут испытывать нарушения в эндокринной системе из-за перегрузки железом, и могут развиваться диабет, гипотиреоз и гипогонадизм. Однако пациенты с большой талассемией обычно испытывают перегрузку железом в более раннем возрасте, чем пациенты с промежуточной талассемией, и поэтому могут испытывать задержку роста и задержку полового созревания. Кроме того, пациенты с большой талассемией подвергаются повышенному риску сердечной недостаточности из-за вызванной железом кардиомиопатии – состояния, которое значительно реже встречается у пациентов с

промежуточной талассемией (*Musallam KM, 2013*). У пациентов с промежуточной талассемией наблюдается связь между повышенной концентрацией железа в печени и развитием фиброза печени и печеночной недостаточности, потенциально ведущих к гепатоцеллюлярной карциноме (*Vichinsky E., "Non-transfusion-dependent thalassemia and thalassemia intermedia: epidemiology, complications, and management". Current Medical Research and Opinion, 2016; 32(1): 191–204*).

Долгосрочный прогноз для пациентов, страдающих от талассемии, зависит от типа и тяжести состояния. Например, тяжелая талассемия может вызвать раннюю смерть из-за сердечной недостаточности или осложнений со стороны печени, в то время как менее тяжелые формы талассемии часто не сокращают продолжительность жизни. Пациенты с большой талассемией могут дожить до возраста более 40 лет, если им хорошо переливают кровь и они придерживаются терапии хелаторами железа. Большинство (71%) случаев смерти от большой талассемии связано с сердечными осложнениями, являющимися результатом перегрузки железом (*Galanello R, Origa R., "Beta-thalassemia." Orphanet Journal of Rare Diseases. 2010; 5: 11*).

Диагностика бета-талассемии различается для большой талассемии и промежуточной талассемии. Пациенты с большой талассемией обычно проявляются через 6-24 месяца после рождения с симптомами, заключающимися в микроцитарной анемии, легкой желтухе и гепатоспленомегалии. Гематологические результаты включают уровни гемоглобина менее 7 г/дл, MCV (средний объем клеток) от 50 до 70 фл и/или MCH (средний клеточный гемоглобин) от 12 до 20 пг (*Cappellini MD, 2014*).

Пациенты с промежуточной талассемией обычно проявляются позже, чем пациенты с большой талассемией, в возрасте от 2 до 6 лет в случаях с более тяжелыми проявлениями заболевания, в то время как пациенты на более легкой стадии могут оставаться бессимптомными и во взрослом возрасте. Как правило, у пациентов с промежуточной талассемией присутствуют сходные, но более мягкие симптомы по сравнению с пациентами с большой талассемией, и у пациентов с промежуточной талассемией часто присутствует экстрамедуллярное кроветворение. Гематологические результаты включают уровень гемоглобина от 7 до 10 г/дл, MCV от 50 до 80 фл и/или MCH от 16 до 24 пг (*Cappellini MD, 2014*).

После гипотезы о диагнозе на основании клинической картины и гематологических данных получают подтверждение с помощью генетического анализа. Доступны как специфичная для мутаций ПЦР-амплификация, так и полное секвенирование гена β -глобина (*Galanello R, 2010*).

Существуют различные фармацевтически активные лекарственные средства из

группы хелаторов железа для лечения перегрузки железом или легких и умеренных фенотипов β -талассемии, таких как малая β -талассемия и трансфузионно независимая промежуточная β -талассемия.

Другим лекарственным средством, находящимся в продвинутой стадии клинического исследования с разрешением на продажу для лечения или облегчения тяжелой трансфузионно-зависимой β -талассемии, является луспатерцепт, представляющий собой рекомбинантный инженерный белок, действующий как ингибитор передачи сигналов ActRIIB, который предназначен для нейтрализации некоторых белков из семейства TGF- β , которые замедляют созревание RBC. Луспатерцепт вводят парентерально. Луспатерцепт и его применение при лечении трансфузионно-зависимой талассемии описаны, например, в WO2016183280.

Синтетический человеческий гепсидин LJPC-401 компании La Jolla Pharmaceutical и пептидомиметик гепсидина PTG-300 компании Protagonists Therapeutics, оба для парентерального введения, вошли в фазу II испытания при исследовании β -талассемии.

Однако парентеральное введение лекарств обычно требует медицинского обслуживания, что еще больше увеличивает затраты на лечение и может негативно повлиять на соблюдение пациентом требований и ложится дополнительным бременем на пациента. Напротив, пероральное введение лекарственных средств имеет преимущества перед парентеральным введением, такие как простота введения пациентами, в частности детьми, высокая степень гибкости дозировок и композиции, экономическая эффективность, меньшие ограничения стерильности и риски инфекции, реакции в месте инъекции и генерация антител к лекарственным средствам. В настоящее время ни одно пероральное лекарственное средство для лечения анемии при тяжелых формах β -талассемии, в частности TDT, не одобрено.

Учитывая значительную угрозу для жизни пациентов, страдающих от тяжелых форм β -талассемии, таких как TDT, очевидно, что требуются новые и улучшенные варианты лечения, которые обеспечивают повышенную выживаемость и улучшение качества жизни пациентов, страдающих от тяжелой β -талассемии.

J. H. Baek et al. "Ferroportin inhibition attenuates plasma iron, oxidant stress, and renal injury following red blood cell transfusion in guinea pigs"; Transfusion 2020 Mar; 60(3):513-523, сообщают о результатах по снижению уровня железа в плазме, уровней NTBI, окислительного стресса и повреждения клеток путем внутривенного введения низкомолекулярного ингибитора ферропортина VIT-2653, предоставленного Vifor (International) Ltd., сразу после скорых трансфузий красных клеток крови на модели с морскими свинками.

Кроме описанного лечения луспатерцептом, TDT до сих пор традиционно лечат регулярными переливаниями крови (трансфузиями RBC), сопровождаемыми регулярной совместной терапией хелатными соединениями железа, которая нацелена на постоянное удаление избытка железа, возникающего в результате вторичной перегрузки железом, вызванной регулярными переливаниями крови.

Устоявшиеся препараты, используемые в хелатной терапии, включают дефероксамин (также известный как десферриоксамин В; или десферал®). Двумя новыми препаратами для терапии хелаторами железа, лицензированными для применения у пациентов, получающих регулярные переливания крови для лечения талассемии, приводящей к развитию перегрузки железом, являются деферазирокс (также известный как Эксиджад®) и деферипрон (также известный как Феррипрокс®).

В WO2013/086312 A1 описываются пероральные препараты, включающие аналоги полиэфира дезазадесферритиоцина (desazadesferrithiocin) (DADFT-PE), для лечения перегрузки железом, включая лечение субъектов, страдающих от трансфузионно независимой талассемии и наследственных и приобретенных анемий, зависящих от трансфузии, посредством хелатирования железа в качестве основного механизма действия.

Недостатком лечения TDT только регулярными переливаниями крови и сопутствующим лечением возникающей вторичной перегрузки железом с помощью хелатной терапии является сохраняющаяся необходимость регулярного удаления избытка железа из организма и бремя пожизненной регулярной трансфузии и хелатной терапии для пациентов. Кроме того, известно, что устоявшиеся препараты для терапии хелаторами железа обладают токсическим потенциалом, что становится особенно проблематичным при длительном введении, вызванном пожизненной необходимостью в терапии TDT.

Однако, как показано в примерах в настоящем изобретении, сочетание обычной хелатной терапии с ингибиторами ферропортина по настоящему изобретению в комбинированной терапии оказалось дополнительным эффективным подходом в новом лечении талассемии, в частности при TDT.

Низкомолекулярные соединения, обладающие активностью ингибиторов ферропортина, и их применение для лечения перегрузки железом при легкой и умеренной β -талассемии (например, промежуточной β -талассемии) путем перорального введения описаны в международных заявках WO2017/068089 и WO2017/068090. Кроме того, международная заявка WO2018/192973 относится к конкретным солям избранных ингибиторов ферропортина, описанных в WO2017/068089 и WO2017/068090. Ингибиторы ферропортина, описанные в указанных трех международных заявках, совпадают с

соединениями формулы (I), используемыми в новом медицинском применении по настоящему изобретению.

Однако ни в одном из указанных документов не описывается эффективность указанных ингибиторов ферропортина при лечении трансфузионно-зависимой β -талассемии (TDT) и не раскрывается возможность эффективного лечения TDT или облегчения бремени, связанного с обычными методами лечения TDT.

Задача, решаемая изобретением

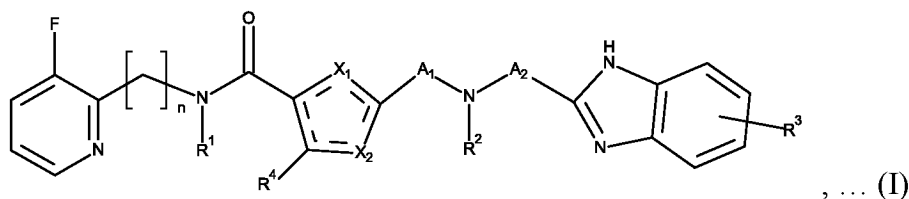
Задачей, решаемой в настоящем изобретении, является создание нового способа лечения тяжелых форм β -талассемии, таких как, в частности, трансфузионно-зависимая β -талассемия (TDT). В частности, задачей настоящего изобретения можно считать получение новых лекарственных соединений для эффективного лечения TDT и симптомов и патологических состояний, связанных с ней, или облегчения бремени, связанного с обычными способами лечения TDT. В частности, должны быть предоставлены новые лекарственные соединения для лечения TDT и связанных с ней симптомов и патологических состояний или для облегчения бремени, связанного с обычными методами лечения TDT, с использованием улучшенных путей введения, таких как, в частности, пероральный путь введения, для упрощения введения, уменьшения побочных эффектов, являющихся результатом парентерального введения, повышения приверженности пациентов лечению, оптимизации затрат на безопасное лечение и снижения бремени лечения для пациентов. В другом аспекте задачей изобретения можно считать получение соединений для лечения TDT и связанных с ней симптомов и патологических состояний, которые можно получить легче и дешевле, чем лекарственные средства на основе рекомбинантных инженерных белков или генетически модифицированных лекарственных соединений. Другой аспект относится к новой комбинированной терапии для лечения тяжелых форм β -талассемии, такой как, в частности, TDT, путем введения перорального ингибитора ферропортина, описанного в настоящем документе, в комбинированной терапии с хелатором железа, в частности с деферазироксом.

Описание изобретения

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что соединения общей формулы (I), определенные в настоящем документе, которые действуют как ингибиторы ферропортина (FpnI), можно использовать для лечения тяжелых форм β -талассемии, таких как трансфузионно-зависимая β -талассемия, включая, в частности, большую β -талассемию и β -талассемию с гемоглобином E, а также симптомы и патологические состояния, связанные с ними, такие как, в частности, дефектная продукция красных клеток крови в костном мозге, неэффективный эритропоэз, низкие уровни

гемоглобина/анемия, дисфункция многих органов, перегрузка железом, нагрузка печени железом и перегрузка сердца железом, бледность, усталость, желтуха и спленомегалия.

Соответственно, первый аспект настоящего изобретения относится к соединениям согласно формуле (I), приведенной ниже, для применения при лечении трансфузионно-зависимой β -талассемии (TDT):



причем

X^1 представляет собой N или O; и

X^2 представляет собой N, S или O;

при условии, что X^1 и X^2 являются различными;

R^1 выбирают из группы, состоящей из

- водорода и
- необязательно замещенного алкила;

n равен целому числу от 1 до 3;

A^1 и A^2 выбирают независимо из группы алкандиила;

R^2 представляет собой

- водород или
- необязательно замещенный алкил;

или

A^1 и R^2 вместе с атомом азота, с которым они связаны, образуют необязательно замещенный 4-6-членный цикл;

R^3 обозначает 1, 2 или 3 необязательных заместителя, которые можно выбрать независимо из группы, состоящей из

- галогена,
- циано,
- необязательно замещенного алкила,
- необязательно замещенного алкокси и
- карбоксильной группы;

R^4 выбирают из группы, состоящей из

- водорода,
- галогена,
- C_1 - C_3 -алкила и

- замещенного галогеном алкила;
включая также их фармацевтически приемлемые соли, сольваты, гидраты и полиморфы.

Медицинское назначение

Настоящее изобретение относится к новому медицинскому применению соединений формулы (I) и их солей, сольватов, гидратов и полиморфов, описанных в настоящем документе, для лечения тяжелых форм β -талассемии, таких как, в частности, трансфузионно-зависимая β -талассемия (TDT), включая, в частности, большую β -талассемию и тяжелые формы β -талассемии с гемоглобином E. Как упоминалось выше, тяжелые формы β -талассемии и β -талассемии с гемоглобином E требуют, чтобы пациентам, страдающим от таких заболеваний, регулярно переливали кровь/трансфузировали красные клетки крови (трансфузировали RBC). Таким образом, такие тяжелые формы β -талассемии тоже включаются в трансфузионно-зависимую β -талассемию (TDT).

Таким образом, настоящее изобретение также относится к способу лечения тяжелых форм β -талассемии, таких как, в частности, трансфузионно-зависимая β -талассемия (TDT), включая, в частности, большую β -талассемию и тяжелые формы β -талассемии с гемоглобином E, путем введения пациенту, нуждающемуся в этом, одного или нескольких соединений формулы (I), определенных в настоящем документе, включая их фармацевтически приемлемые соли, сольваты, гидраты и полиморфы.

Новые применение и способ лечения согласно настоящему изобретению включают введение соединений формулы (I) по настоящему изобретению, определенных в настоящем документе, включая их фармацевтически приемлемые соли, сольваты, гидраты и полиморфы, пациентам, страдающим от β -талассемии или β -талассемии с гемоглобином E и требующим регулярного переливания крови.

В частности, новые применение и способ лечения согласно настоящему изобретению включают введение соединений формулы (I) по настоящему изобретению, определенных в настоящем документе, включая их фармацевтически приемлемые соли, сольваты, гидраты и полиморфы, пациентам, страдающим от большой β -талассемии и/или тяжелой β -талассемии с гемоглобином E, предпочтительнее пациентам, страдающим от большой β -талассемии.

Термины «лечить», «лечение» или «лечат» в контексте нового применения по настоящему изобретению включают уменьшение интенсивности по меньшей мере одного симптома или патологического состояния, связанного с трансфузионно-зависимой β -талассемией. Неограничивающие примеры симптомов или патологических состояний,

связанных с трансфузионно-зависимой β -талассемией, включают дефектную продукцию красных клеток крови в костном мозге, неэффективный эритропоэз, недостаточные уровни гемоглобина, дисфункцию многих органов, перегрузку железом, анемию, нагрузку железом печени и перегрузку железом сердца, бледность, усталость, желтуху и спленомегалию.

Термины «лечить», «лечение» или «лечащий» в контексте настоящего изобретения также включает профилактику, например, путем введения соединений по настоящему изобретению до или в сопровождение переливанию крови для предотвращения или по меньшей мере ослабления возникновения патологических состояний, вызванных переливанием.

Пациенты с TDT имеют серьезную перегрузку железом из-за регулярного переливания крови (ВТ). Основными целями терапии переливания крови при лечении β -талассемии являются коррекция анемического состояния и подавление эритропоэза. Считается, что это достигается при уровне Hb ≥ 9 г/дл. ВТ вызывает временную апрегуляцию гепсидина, который возвращается к базовым величинам при снижении уровней гемоглобина (Hb) (*Pasricha S. R. et al., "Transfusion suppresses erythropoiesis and increases hepcidin in adult patients with beta-thalassemia major: a longitudinal study". Blood, 2013; 122(1), 124-33*). Введение соединений ингибиторов ферропортина формулы (I) согласно настоящему изобретению помогает предотвратить поглощение железа в кишечнике во время интервалов между переливаниями, что помогает снизить дополнительную нагрузку железом у пациентов с TDT.

Еще важнее, что ВТ генерирует железо, не связанное с трансферрином (NTBI), которое высвобождается макрофагами, перерабатывающими поврежденные RBC, содержащиеся в единицах трансфузированных RBC, и запускает окислительный стресс, повреждение сосудов и перегрузку органов железом (*Baek J. H. et al., "Iron accelerates hemoglobin oxidation increasing mortality in vascular diseased guinea pigs following transfusion of stored blood". JCI Insight, 2017; 2(9)*). Соответственно, пациенты с талассемией на регулярной терапии ВТ и хелаторами железа имеют повышенные уровни NTBI, которые коррелируют с наличием заболеваний сердца (*Piga A, et al., "High nontransferrin bound iron levels and heart disease in thalassemia major". Am. J. Hematol., 2009; 84(1), 29-33*). Обнаружено, что соединения формулы (I) по настоящему изобретению, которые действуют как ингибиторы ферропортина, предотвращают такие вредные эффекты путем секвестрации железа в макрофагах и, следовательно, прерывают порочный замкнутый круг при β -талассемии.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что соединения формулы (I) по

настоящему изобретению особенно хорошо подходят для лечения трансфузионно-зависимой талассемии путем ограничения доступности железа для образования токсичных агрегатов альфа-глобина. Также обнаружено, что соединения формулы (I) по настоящему изобретению особенно хорошо подходят для лечения трансфузионно-зависимой талассемии путем ограничения реактивных форм кислорода (ROS) в предшественниках эритроидов и улучшения таким образом эритропоэза у пациентов, страдающих от тяжелых форм β -талассемии, таких как TDT. В результате большее количество RBC с увеличенной продолжительностью жизни уменьшает интенсивность анемии у пациентов с TDT и улучшает насыщение тканей кислородом. При TDT соединения формулы (I) также эффективно снижают повышенные уровни NTBI, что помогает предотвратить возникновение патологических состояний, возникающих в результате этого, таких как, например, перегрузка сердца железом и, следовательно, сердечных заболеваний.

NTBI, который охватывает все формы сывороточного железа, которые не ассоциированы тесно с трансферрином, химически и функционально является гетерогенным. LPI (лабильное плазменное железо) представляет собой компонент NTBI, который является одновременно редокс-активным и хелатируемым, способным проникать в органы и индуцировать перегрузку тканей железом. Соединения формулы (I) обладают потенциалом для эффективного снижения повышенных уровней LPI при TDT.

Следующие параметры можно определить для оценки эффективности соединений по настоящему изобретению в новом медицинском применении: сывороточное железо, уровни NTBI, уровни LPI (лабильное железо плазмы), эритропоэтин, TSAT (насыщение трансферрином), Hb (гемоглобин), Hct (гематокрит), MCV (средний объем клеток), MCH (средний клеточный гемоглобин), RDW (ширина распределения эритроцитов) и числа ретикулоцитов, числа форменных элементов крови, масса селезенки и печени, эритропоэз в селезенке и костном мозге, содержание железа в селезенке и печени и агрегаты альфа-глобина в мембранах RBC. Определение можно выполнить с использованием обычных методов в технике, в частности, методов, описанных подробнее ниже. Соединения (I) по настоящему изобретению подходят для улучшения по меньшей мере одного из указанных параметров.

Как поясняют *Patel et al. (2012; цитировано выше)*, в нормальных физиологических условиях уровень трансферрина достаточен для полного удаления свободного железа, обеспечивая отсутствие NTBI и, соответственно, уровни NTBI у нормальных здоровых людей не превышают 1 мкмоль/л и в основном не обнаруживаются большинством обычных методов. В отсутствие трансферрина сообщается об уровнях NTBI до 20 мкмоль/л, а в присутствии недостаточных уровней трансферрина обнаружены уровни

NTBI до 10 мкмоль/л. Однако, как описано в *Patel et al. (2012)*, и *Brissot et al. (2012)*, определение сильно зависит от применяемого метода и используемого анализа, и необходимо учитывать технические трудности, возникающие при определении гетерогенных химических форм циркулирующего NTBI. Например, измерения флуоресценции с воспроизводимой точностью до 0,1 мкМ/л описаны Hider et al. (2010), цитировано по *Brissot et al. (2012)*. Согласно *Patel et al. (2012; таблица 1)*, повышенные уровни NTBI в клинических условиях перегрузки железом колеблются от 0,25 до 4,0 мкмоль/л (с различной точностью и различными методами определения). Учитывая это, в отношении настоящего изобретения уровни NTBI считаются повышенными, если оно обнаруживается известными методами (например, методами, описанными в *Patel et al. (2012)*, или в *Brissot et al. (2012)*, предпочтительно при превышении уровня 0,1 мкмоль/л.

В одном конкретном аспекте новое лечение по настоящему изобретению приводит к уровням NTBI у пациента, сниженным по меньшей мере на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или по меньшей мере на 100%, определенным в любое время в пределах периода времени до 72 часов, до 60 часов, до 48 часов, до 36 часов, до 24 часов или до 12, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 1 и 0,5 часов после введения, и по сравнению с уровнями NTBI у пациента, определенными в любой момент времени в пределах 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24, 36 или 48 часов или до <1 недели до начала лечения по изобретению. NTBI можно определить согласно анализам, описанным ниже в примерах.

В одном конкретном аспекте новое лечение по настоящему изобретению приводит к уровням LPI у пациента, сниженным по меньшей мере на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или по меньшей мере на 100%, определенным в любое время в пределах периода времени до 72 часов, до 60 часов, до 48 часов, до 36 часов, до 24 часов или до 12, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 1 и 0,5 часов после введения, и по сравнению с уровнями общего LPI у пациента, определенными в любой момент времени в пределах 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24, 36 или 48 часов или до <1 недели до начала лечения по изобретению. LPI можно определить согласно анализу, описанному ниже в примерах.

В другом аспекте авторы настоящего изобретения обнаружили, что количественное определение агрегатов альфа-глобина в RBC является важным биомаркером эффективности соединений по настоящему изобретению в присутствии или в отсутствие переливаний крови. Агрегаты альфа-глобина измеряют методом, описанным ниже в примерах.

Осажденные агрегаты альфа-глобина содержат гем и железо, которые генерируют

реактивные формы кислорода (ROS), что ведет к сокращенной продолжительности жизни RBC, анемии и гипоксии тканей. Путем уменьшения агрегатов альфа-глобина в RBC у пациентов с TDT соединения формулы (I) по настоящему изобретению улучшают эритропоэз, что имеет потенциал для снижения трансфузионной нагрузки у пациентов с TDT. Влияние соединений по настоящему изобретению на уровни ROS в донорных RBC можно контролировать с помощью коммерчески доступного датчика, чувствительного к ROS с дальним красным или зеленым излучением, например как описано ниже в примерах.

Соответственно в другом аспекте новое лечение по настоящему изобретению приводит к уровням агрегатов альфа-глобина у пациента, сниженным по меньшей мере на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или по меньшей мере на 100%, определенным в любое время в пределах периода времени до 1 недели, до 2 недель, до 3 недель, до 4 недель, до 3 месяцев после первого введения, и по сравнению с уровнями агрегатов альфа-глобина у пациента, определенными в любой момент времени в пределах 1 недели, 2 недель, 3 недель или 4 недель до начала лечения по изобретению. Уровни агрегатов альфа-глобина в RBC можно определить согласно анализу, описанному ниже в примерах.

В другом аспекте новое лечение по настоящему изобретению приводит к уровням ROS в RBC пациентов, сниженным по меньшей мере на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или по меньшей мере на 100%, определенным в любое время в пределах периода времени до 5 дней, до 6 дней, до 7 дней, до 8 дней, до 10 дней, до 11 дней, до 12 дней, до 13 дней, до 14 дней, до 15 дней, до 16 дней, до 17 дней, до 18 дней, до 19 дней, до 20 дней, до 21 дня и до 1 месяца после первого введения и/или после ишемического события, и по сравнению с уровнями ROS в RBC у пациента, определенными в любой момент времени в пределах 12 часов, 24 часов, 36 часов, 48 часов, 1 недели, 2 недель, 3 недель или 4 недель до начала лечения по изобретению. Уровни ROS в RBC можно определить согласно анализу, описанному ниже в примерах.

Как поясняется выше, снижение уровней NTBI и LPI способствует снижению концентрации железа в печени и концентрации железа в миокарде.

Соответственно в другом аспекте новое лечение может привести к снижению концентрации железа в печени у пациента по меньшей мере на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или по меньшей мере на 100%, определенной в любое время в пределах периода времени до одной недели, до 2 недель, до 3 недель, до 4 недель, до 3 месяцев после

первого введения, и по сравнению с уровнями концентрации железа в печени у пациента, определенными в любой момент времени в пределах 1 недели, 2 недель, 3 недель или 4 недель до начала лечения по изобретению. Концентрацию железа в печени можно определить согласно анализу, описанному ниже в примерах.

В другом аспекте новое лечение может привести к снижению миокардиальной концентрации железа у пациента по меньшей мере на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или по меньшей мере на 100%, определенной в любое время в пределах периода времени до одной недели, до 2 недель, до 3 недель, до 4 недель, до 3 месяцев после первого введения, и по сравнению с уровнями миокардиальной концентрации железа у субъекта, определенными в любой момент времени в пределах 1 недели, 2 недель, 3 недель или 4 недель до начала лечения по изобретению. Миокардиальную концентрацию железа можно определить согласно анализу, описанному ниже в примерах.

В другом аспекте новое лечение может привести к уменьшению размера селезенки у пациента по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или по меньшей мере на 100%, определенному в любое время в пределах периода времени до одной недели, до 2 недель, до 3 недель, до 4 недель, до 3 месяцев после первого введения, и по сравнению с размером селезенки у субъекта, определенными в любой момент времени в пределах 1 недели, 2 недель, 3 недель или 4 недель до начала лечения по изобретению. Размер селезенки можно определить согласно обычным методам.

В другом аспекте новое лечение может привести к улучшению по меньшей мере одного из параметров Hct, MCV, MCH, RDW и числа ретикулоцитов у пациента по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или по меньшей мере на 100%, определенных в любое время в пределах периода времени до одной недели, до 2 недель, до 3 недель, до 4 недель, до 3 месяцев после первого введения, и по сравнению с соответствующими параметрами у субъекта, определенными в любой момент времени в пределах 1 недели, 2 недель, 3 недель или 4 недель до начала лечения по изобретению. Указанные параметры можно определить согласно обычным методам.

В другом аспекте новое лечение может привести к эритроидному ответу, который включает снижение трансфузионной нагрузки у пациента по меньшей мере на 33%, предпочтительно по меньшей мере на 50%. В принципе эритроидный ответ может включать снижение трансфузионной нагрузки у пациента по меньшей мере на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 33%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%,

95%, 98% или 100%. В другом аспекте новое лечение может привести к эритроидному ответу, который включает снижение трансфузионной нагрузки у пациента по меньшей мере на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 33%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% в течение по меньшей мере 2 недель, 3 недель, 4 недель, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 12 месяцев, до 18 месяцев, до 24 месяцев или даже дольше до независимости от трансфузии. В другом аспекте новое лечение может привести к эритроидному ответу, который включает снижение трансфузии красных клеток крови для пациента по меньшей мере на 1, 2, 3, 4 или больше единиц красных клеток крови. В другом аспекте новое лечение может привести к эритроидному ответу, который включает снижение трансфузии красных клеток крови для пациента по меньшей мере на 1, 2, 3, 4 или больше единиц красных клеток крови в течение по меньшей мере 2 недель, 3 недель, 4 недель, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 12 месяцев, до 18 месяцев, до 24 месяцев или даже дольше до независимости от трансфузии единиц клеток красной крови. Также возможно, что эритроидный ответ включает одно или больше из указанных выше улучшений. Эритроидный ответ можно определить так, как описано ниже в примерах.

В настоящем документе одной единицей красных клеток крови называется количество упакованных красных клеток крови, полученных из приблизительно 200-500 мл донорской крови. Обычно переливания крови регулируют в зависимости от возраста, тяжести заболевания и исходных параметров крови пациента. Указания по выбору количества переливаний рекомендуют, например:

		Гематокрит донорских красных клеток			
		50%	60%	75%	80%
Целевое повышение уровня гемоглобина	2 г/дл	12 мл/кг	10 мл/кг	8 мл/кг	7,5 мл/кг
	3 г/дл	18 мл/кг	15 мл/кг	12 мл/кг	11,2 мл/кг
	4 г/дл	24 мл/кг	20 мл/кг	16 мл/кг	15 мл/кг

Индивидуальный объем крови для переливания можно также вычислить с помощью следующей формулы:

$$(\text{желаемый} - \text{фактический Hb}) \times \text{масса тела [кг]} \times 3 / \text{гематокрит перелитой единицы} = \text{мл для переливания}$$

Согласно рекомендованной схеме трансфузии в случае большой талассемии переливают эквивалент 100-200 мл чистых красных клеток крови (RBC) на кг массы тела в год.

В другом аспекте новое лечение может привести к снижению трансфузионной

нагрузки у пациента по сравнению с трансфузионной нагрузкой для пациента в пределах 1 недели, 2 недель, 3 недель или 4 недель, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 6 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 12 месяцев, 24 месяцев до начала лечения по изобретению.

В другом аспекте можно добиться, что с новым лечением пациенту с трансфузионно-зависимой β -талассемией, лечившемуся согласно новому способу по настоящему изобретению, не потребуются трансфузии красных клеток крови в течение по меньшей мере 2 недель, 3 недель, 4 недель, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяцев или даже дольше до независимости от трансфузий красных клеток крови после лечения.

В другом аспекте новое лечение может привести к уменьшению ежедневной терапии хелаторами железа у пациента, такой как, например, уменьшение дозы или частоты введения одного или нескольких терапевтических агентов для хелатирования железа, вводимых пациенту. Неограничивающие примеры терапевтических агентов для хелатирования железа, включают агенты, указанные выше.

В другом аспекте новое лечение может привести к сывороточным уровням ферритина у пациента, сниженным по меньшей мере на, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или по меньшей мере на 100%, определенным в любое время в пределах периода времени до одной недели, до 2 недель, до 3 недель, до 4 недель, до 3 месяцев после первого введения, и по сравнению с сывороточными уровнями ферритина у пациента, определенными в любой момент времени в пределах 1 недели, 2 недель, 3 недель или 4 недель до начала лечения по изобретению. Сывороточные уровни ферритина можно определить согласно обычным анализам.

В другом аспекте новое лечение может привести к уменьшению симптомов, связанных с одним или несколькими клиническими осложнениями трансфузионно-зависимой β -талассемии. Неограничивающие примеры симптомов трансфузионно-зависимой β -талассемии включают задержку роста, бледность, желтуху, слабую мускулатуру, вальгусное колено, гепатоспленомегалию, язвы на ногах, развитие масс в результате экстрамедуллярного кроветворения, изменения скелета в результате расширения костного мозга и клинические осложнения хронических трансфузий красных клеток крови, такие как, например, заражение вирусом гепатита В, заражение вирусом гепатита С и заражение вирусом иммунодефицита человека, аллоиммунизация и повреждение органов из-за перегрузки железом, такое как, например, повреждение

печени, повреждение сердца и повреждение эндокринных желез. Хотя ожидается, что соединения формулы (I) не будут напрямую влиять на фактор дифференцировки роста 11 (GDF11), также может произойти уменьшение деформаций скелета, вызванное снижением экстрamedуллярного эритропоэза. Соответственно, соединения формулы (I), определенные в настоящем документе, обладают потенциалом для косвенного улучшения при таком патологическом состоянии.

В другом аспекте новое лечение может привести к улучшению качества жизни у пациентов по сравнению с качеством жизни у пациентов, определенным в пределах 1, 2, 3 или 4 недель до начала лечения по изобретению. Улучшение качества жизни определяют в пределах 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 или 24 месяцев после начала лечения по изобретению. Качество жизни можно определить согласно анализу, описанному ниже в примерах.

С новым способом лечения согласно настоящему изобретению можно добиться одного или нескольких указанных выше улучшений.

Группа пациентов

Настоящее изобретение относится к новому медицинскому применению соединений формулы (I) и их солей, сольватов, гидратов и полиморфов, описанных в настоящем документе, для лечения тяжелых форм β -талассемии.

В принципе, субъекты, подлежащие лечению в соответствии с новым применением согласно изобретению, могут представлять собой любых млекопитающих, таких как грызуны и приматы, и в предпочтительном аспекте новое медицинское применение относится к лечению людей. Субъекты, страдающие от тяжелых форм β -талассемии и подлежащие лечению новым способом согласно изобретению, также называются «пациентами».

Субъекты, подлежащие лечению, могут быть любого возраста. Предпочтительный аспект изобретения относится к лечению детей и подростков. Соответственно в одном предпочтительном аспекте изобретения субъекты, подлежащие лечению новыми способами, описанными в настоящем документе, моложе 18 лет. Конкретнее, субъекты, подлежащие лечению новыми способами, описанными в настоящем документе, могут быть моложе 16 лет, моложе 15 лет, моложе 14 лет, моложе 13 лет, моложе 12 лет, моложе 11 лет, моложе 10 лет, моложе 9 лет, моложе 8 лет, моложе 7 лет, моложе 6 лет или моложе 5 лет. В другом аспекте изобретения субъекты, подлежащие лечению новыми способами, описанными в настоящем документе, имеют возраст 1-3 года, 3-5 лет, 5-7 лет, 7-9 лет, 9-11 лет, 11-13 лет, 13-15 лет, 15-20 лет, 20-25 лет, 25-30 лет или больше 30 лет. В случае лечения взрослых субъекты, подлежащие лечению новыми способами, описанными в настоящем документе, имеют возраст 18-25 лет, 20-25 лет, 25-30 лет, 30-35

лет, 35-40 лет, 40-45 лет, 45-50 лет, 50-55 лет, 55-60 лет или больше 60 лет. В случае лечения пожилых пациентов субъекты, подлежащие лечению новыми способами, описанными в настоящем документе, имеют возраст 60-65 лет, 65-70 лет, 70-75 лет, 75-80 лет или больше 80 лет.

Лечение детей и подростков является особенно предпочтительным из-за значительных преимуществ, предоставляемых лечением ингибиторами ферропортина соединениями формулы (I) по настоящему изобретению. Указанные соединения можно вводить перорально, что является преимуществом по сравнению с парентеральным введением доступных на сегодняшний день лекарств (например, луспатерцепта). Кроме того, оказалось, что перорально биодоступные ингибиторы ферропортина по настоящему изобретению обладают умеренной биодоступностью и временем полужизни в организме и, таким образом, относительно быстро вымываются. Это приводит к меньшему количеству побочных эффектов и более быстрой обратимости лекарства, что является особенно важным при лечении детей.

Группу или популяцию пациентов, страдающих от тяжелых форм β -талассемии и подлежащих лечению новым способом согласно изобретению, выбирают из субъектов (пациентов), имеющих

а) генотип из группы, состоящей из β^0/β^0 , β^+/β^+ , β^0/β^+ и β^0/HbE , предпочтительно β^+/β^+ , β^0/β^+ и β^0/HbE , и/или

б) генотип, включающий совместное наследование двух тяжелых мутаций бета-цепи гемоглобина. Здесь « β^0 » относится к аллелю, связанному с отсутствием синтеза субъединицы бета-глобина. « β^+ » относится к аллелю, связанному со сниженным синтезом субъединицы бета-глобина. «Hb» относится к белку гемоглобина. «HbE» или «гемоглобин E» является общепризнанным термином и относится к мутировавшей форме гемоглобина, например человеческого гемоглобина. Гемоглобин E содержит две альфа-субъединицы и две бета-субъединицы, в которых положение 26 бета-субъединицы мутировано от глутаминовой кислоты на лизин (E26K). « β -талассемия HbE» относится к совместному наследованию гемоглобина E и аллеля β^0 .

В другом аспекте изобретения группы пациентов, подлежащих лечению новым способом по настоящему изобретению, также имеют наследственную персистенцию фетального гемоглобина.

В другом аспекте изобретения группу или популяцию пациентов, страдающих от тяжелых форм β -талассемии и подлежащих лечению новым способом согласно изобретению, выбирают из субъектов (пациентов), имеющих повышенные уровни NTBI. Уровни NTBI считаются повышенными, если их можно обнаружить с помощью

известных методов, как обсуждалось выше. Предпочтительно уровни NTBI $\geq 0,1$ мкМ/л считаются повышенными у пациентов с TDT. Предпочтительнее повышенные уровни NTBI у пациентов с TDT («большая TD и CH»; CH = получающие хелатирование) согласно настоящему изобретению соответствуют величинам NTBI, превышающим величины, определенные у пациентов с NTDT («большая наивная» или «промежуточная наивная» категория) в соответствующем способе определения, как описано в *de Swart et al. "Second international round robin for the quantification of serum non-transferrin-bound iron and labile plasma iron in patients with iron-overload disorders"*, *Haematologica*, 2016; 101(1): 38–45, таблица 2:

N		NTBI assays									
Assay ID		N1		N2 ^a		N3 ^a		N4 ^b		N6	
Assay subgroup		DCI		NTBI		NTBI		NTBI		Isoform	
Disease/Total	60	1.60	(0.37)	-0.73	(0.20)	1.32	(0.14)	2.19	(0.64)	1.10	(0.15)
β-Thalassemia											
4. Major Naïve	6	0.61	(0.25)	-1.19	(0.17)	0.76	(0.05)	1.68	(1.07)	1.08	(0.36)
5. Major TD & CH	6	5.79	(0.65)	0.38	(0.27)	2.46	(0.12)	4.00	(0.67)	0.87	(0.11)
6. Intermedia Naïve	7	3.32	(0.44)	0.04	(0.17)	2.46	(0.17)	3.74	(2.25)	1.51	(0.06)

* DCI = непосредственно хелатируемое железо

NTBI assays – Анализы NTBI, Assay ID - ID анализа

Assay subgroup – Аналитическая подгруппа

Disease/Total – Заболевание/Общее, β -Thalassemia – β -Талассемия

Major Naïve - Большая наивная,

Major TD & CH - Большая TD и CH

Intermedia Naïve – Промежуточная наивная

В другом аспекте изобретения группу или популяцию пациентов, страдающих от тяжелых форм β -талассемии и подлежащих лечению новым способом согласно изобретению, выбирают из субъектов (пациентов), имеющих повышенные уровни LPI. Уровни LPI считаются повышенными, если обнаруживаются известными методами, как обсуждалось выше. Предпочтительно повышенные уровни LPI у пациентов с TDT («большая TD и CH») согласно настоящему изобретению соответствуют величинам LPI, превышающим величины, определенные у пациентов с NTDT («большая наивная» или «промежуточная наивная» категория) в соответствующем способе определения, как описано в *de Swart et al. "Second international round robin for the quantification of serum non-transferrin-bound iron and labile plasma iron in patients with iron-overload disorders"* *Haematologica*, 2016; 101(1): 38–45, таблица 2:

Assay ID Assay subgroup	N	LPI assays			
		L1 LPI	L2 LPI	L3 ^{c,d} LPI	L4 ^{c,d} eLPI
Disease/Total	60	0.09 (0.07)	0.24 (0.17)	0.14 (0.04)	0.46 (0.11)

β-Thalassemia					
4. Major Naïve	6	-0.01 (0.04)	0.08 (0.09)	0.01 (0.01)	0.17 (0.05)
5. Major TD & CH	6	0.43 (0.12)	0.68 (0.24)	0.54 (0.15)	1.43 (0.17)
6. Intermedia Naïve	7	0.28 (0.10)	0.64 (0.25)	0.52 (0.06)	0.83 (0.14)

LPI assays – Анализы LPI, Assay ID - ID анализа

Assay subgroup – Аналитическая подгруппа

Disease/Total – Заболевание/Общее, β-Thalassemia – β-Талассемия

Major Naïve - Большая наивная,

Major TD & CH - Большая TD и CH

Intermedia Naïve – Промежуточная наивная

Обычно уровень гемоглобина (Hb) используют для классификации тяжести и формы талассемии. Пациенты, страдающие от легких и умеренных форм талассемии, таких как малая или промежуточная талассемия, поддерживают уровни Hb от 9 до 12 г/дл или от 6 до 7 г/дл соответственно. Пациентов, страдающих от тяжелых форм талассемии, описанных в настоящем документе, т.е. пациентов с TDT, обычно классифицируют по уровню Hb < 7 г/дл в двух последовательных тестах, или среди пациентов с уровнем гемоглобина ≥ 7 г/дл, у которых также имеются изменения лица, переломы скелета, экстрамедуллярное кроветворение или задержка роста. Уровни Hb у пациентов с TDT могут составлять всего 4-5 г/дл. Хотя международные руководства рекомендуют трансфузию пациентам, достигающим диапазона гемоглобина 9-0 г/дл, причем оптимальный диапазон после трансфузии составляет 13-14 г/дл, в клинической практике уровни Hb до 7 г/дл обычно считаются достаточными без регулярной трансфузии, и тогда обычной целью при трансфузии является поддержание у пациентов уровней гемоглобина от 9,5 до 10 г/дл. Достижение рекомендуемых более высоких уровней Hb 13-14 г/дл может потребовать чрезмерного увеличения трансфузионной нагрузки. Однако количество необходимой крови сильно варьируется у пациентов и в значительной степени зависит от массы пациента и целевого уровня гемоглобина.

Учитывая это, в другом аспекте изобретения группу или популяцию пациентов, страдающих от тяжелых форм β-талассемии и подлежащих лечению новым способом согласно изобретению, можно выбрать из субъектов (пациентов), имеющих уровни

гемоглобина (Hb) ниже 7 г/дл или уровень гемоглобина ≥ 7 г/дл, но также имеющих изменения лица, переломы скелета, экстрамедуллярное кроветворение или задержку роста.

В другом аспекте изобретения группу или популяцию пациентов, страдающих от тяжелых форм β -талассемии и подлежащих лечению новым способом согласно изобретению, можно выбрать из субъектов (пациентов), имеющих MCV от 50 до 70 фл.

В другом аспекте изобретения группу или популяцию пациентов, страдающих от тяжелых форм β -талассемии и подлежащих лечению новым способом согласно изобретению, можно выбрать из субъектов (пациентов), имеющих MCH от 12 до 20 пг.

В другом аспекте изобретения группу или популяцию пациентов, страдающих от тяжелых форм β -талассемии и подлежащих лечению новым способом согласно изобретению, можно выбрать из субъектов (пациентов), имеющих одну или несколько характеристик, включающих а) уровни Hb ниже 7 г/дл или уровень гемоглобина ≥ 7 г/дл и изменения лица, переломы скелета, экстрамедуллярное кроветворение или задержку роста, б) MCV от 50 до 70 фл, и с) MCH от 12 до 20 пг.

В другом аспекте изобретения группа или популяция пациентов, страдающих от тяжелых форм β -талассемии и подлежащих лечению новым способом согласно изобретению, получает регулярные переливания крови. Пациенты с талассемией, требующие больше 5 переливаний крови в течение 24 недель (в соответствии с *Cappellini MD, et al., "The Believe Trial: Results of a Phase 3, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Luspatercept in Adult Beta-Thalassemia Patients Who Require Regular Red Blood Cell (RBC) Transfusions". Blood, 2018*), как правило, признаются пациентами с TDT, в то время, как пациенты, требующие 5 или меньшей переливаний крови в течение 24 недель, обычно еще считаются пациентами с NTDT. Однако другие клинические симптомы и параметры также играют важную роль в определении статуса TDT против NTDT, что подробно обсуждалось выше. Регулярные переливания крови также означают больше одной повторной трансфузии единиц красных клеток крови (RBC) в течение временных интервалов по меньшей мере до двух месяцев или с более короткими интервалами. Интервалы могут быть одинаковой продолжительности или могут изменяться в зависимости от каждого пациента, течения заболевания, его тяжести и реакции на лечение. Регулярные переливания крови также могут включать повторяющуюся трансфузию равного или изменяющегося количества трансфузионных единиц в последующие моменты трансфузии. Регулярные переливания крови могут включать

- повторные трансфузии равных единиц RBC с изменяющимися

последовательными временными интервалами или

- повторные трансфузии равных единиц RBC с равными последовательными временными интервалами или

- повторные трансфузии переменных единиц RBC с равными последовательными временными интервалами или

- повторные трансфузии переменных единиц RBC с изменяющимися последовательными временными интервалами.

В другом аспекте изобретения регулярное переливание крови означает периоды без переливания не более 3 месяцев, предпочтительно не более 2 месяцев.

В другом аспекте изобретения группу или популяцию пациентов, страдающих от тяжелых форм β -талассемии и подлежащих лечению новым способом согласно изобретению, выбирают из субъектов (пациентов), которым требуется регулярная терапия хелаторами железа.

Такая группа или популяция пациентов, нуждающихся в регулярной терапии хелаторами железа, может дополнительно характеризоваться одной или несколькими характеристиками, определенными выше.

Формы применения

В другом аспекте изобретения лечение тяжелых форм β -талассемии, таких как трансфузионно-зависимая β -талассемия и/или большая β -талассемия, включает пероральное введение пациенту, нуждающемуся в этом, одного или нескольких соединений формулы (I), их солей, сольватов, гидратов или полиморфов, каждое как описано где-либо в настоящем документе.

Для такой цели соединения формулы (I) согласно изобретению предпочтительно находятся в лекарственных средствах или фармацевтических композициях в форме для перорального введения, включая, например, пилюли, таблетки, такие как таблетки с энтеросолюбильным покрытием, таблетки в пленке и слоистые таблетки, препараты с замедленным высвобождением для перорального введения, депо-препараты, драже, грануляты, эмульсии, дисперсии, микрокапсулы, микроформуляции, наноформуляции, липосомальные препараты, капсулы, такие как капсулы с энтеросолюбильным покрытием, порошки, микросталлические препараты, эипастики, капли, ампулы, растворы и суспензии для перорального введения.

В предпочтительном воплощении изобретения соединения формулы (I) согласно изобретению вводят в форме таблетки или капсулы, как они определены выше. Они могут находиться, например, в кислотостойких формах или с pH-зависимыми покрытиями.

Соответственно, другой аспект настоящего изобретения относится к соединениям

формулы (I) согласно изобретению, включая их фармацевтически приемлемые соли, сольваты, гидраты и полиморфы, а также лекарственные средства, композиции и комбинированные препараты, включающие их, для применения при лечении тяжелых форм β -талассемии, таких как, в частности, трансфузионно-зависимая β -талассемия и/или большая β -талассемия, в виде форм для перорального введения.

Режим дозирования

Другой аспект изобретения относится к соединениям формулы (I) согласно изобретению для применения согласно настоящему изобретению, причем лечение характеризуется одной или несколькими следующими далее схемами дозирования лекарства.

В одном аспекте соединения формулы (I) согласно изобретению можно вводить пациенту, нуждающемуся в этом, в дозе 0,001-500 мг, например, 1-4 раза в день. Однако дозу можно увеличить или уменьшить, в зависимости от возраста, массы, состояния пациента, тяжести заболевания или типа введения. В другом аспекте изобретения соединения формулы (I) можно вводить в дозе 0,1 мг, 0,2 мг, 0,3 мг, 0,4 мг, 0,5 мг, 0,6 мг, 0,7 мг, 0,8 мг, 0,9 мг, 1 мг, 1,5 мг, 2 мг, 2,5 мг, 3 мг, 3,5 мг, 4 мг, 4,5 мг, 5 мг, 6 мг, 7 мг, 8 мг, 9 мг, 10 мг, 11 мг, 12 мг, 13 мг, 14 мг, 15 мг, 16 мг, 17 мг, 18 мг, 19 мг, 20 мг, 25 мг, 30 мг, 35 мг, 40 мг, 45 мг, 50 мг, 55 мг, 60 мг, 65 мг, 70 мг, 75 мг, 80 мг, 85 мг, 90 мг, 95 мг, 100 мг, 105 мг, 110 мг, 115 мг, 120 мг, 125 мг, 130 мг, 135 мг, 140 мг, 145 мг, 150 мг, 155 мг, 160 мг, 165 мг, 170 мг, 175 мг, 180 мг, 185 мг, 190 мг, 195 мг, 200 мг, 205 мг, 210 мг, 215 мг, 220 мг, 225 мг, 230 мг, 235 мг, 240 мг, 245 мг, 250 мг, 255 мг, 260 мг, 265 мг, 270 мг, 275 мг, 280 мг, 285 мг, 290 мг, 295 мг, 300 мг, 325 мг, 350 мг, 375 мг, 400 мг, 425 мг, 450 мг, 475 мг, 500 мг.

Предпочтительной является доза от 0,5 до 500 мг, предпочтительнее от 1 до 300 мг или 3-300 мг, предпочтительнее от 1 до 250 мг.

Наиболее предпочтительной является доза 5 мг, 15 мг, 60 мг, 120 мг или 240 мг.

Вышеуказанные дозы возможно вводить в общей дневной дозе или в виде однократной дозы ежедневно или разделенной на субдозы для введения два или больше раз в день.

В другом аспекте доза составляет от 0,001 до 35 мг/кг массы тела, от 0,01 до 35 мг/кг массы тела, от 0,1 до 25 мг/кг массы тела или можно вводить от 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и до 20 мг/кг массы тела. Особенно предпочтительной является доза 120 мг для пациентов с массой тела > 50 кг и 60 мг для пациентов с массой тела < 50 кг, в каждом случае один раз или дважды в день.

В другом аспекте возможно выбрать одну из указанных выше доз как начальную

дозы и затем вводить 1 или более раз такие же или варьирующиеся дозы, как определено выше, с повторяющимися интервалами от 1 до 7 дней, 1-5 дней, предпочтительно 1-3 дня или каждый второй день.

Начальную дозу и последующие дозы можно выбрать из указанных выше доз и регулировать/изменить в соответствии с потребностями пациента с TDT в пределах предоставленных диапазонов.

В частности, количество последующих доз можно соответствующим образом выбрать в зависимости от конкретного пациента, течения заболевания и реакции на лечение. Можно вводить 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и больше последующих доз.

Допустимо, чтобы начальная доза была равна или отличалась от одной или нескольких последующих доз. Также допустимо, чтобы последующие дозы были одинаковыми или различными.

Повторяющиеся интервалы могут быть одинаковой длительности или могут меняться в зависимости от конкретного пациента, течения заболевания и реакции на лечение.

Предпочтительно последующие дозы уменьшаются по количеству вещества с увеличением порядкового номера последовательной дозы.

Предпочтительно дозу от 3 мг до 300 мг, предпочтительнее от 5 мг до 250 мг, наиболее предпочтительно 5 мг, 15 мг, 60 мг, 120 мг или 240 мг вводят один раз в день в течение периода лечения по меньшей мере 3 дня, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 7 дней. В другом предпочтительном аспекте дозу 60 мг или 120 мг вводят один раз в день. В другом предпочтительном аспекте общую дневную дозу 120 мг вводят путем введения дважды в день дозы 60 мг.

В другом предпочтительном аспекте общую дневную дозу 240 мг вводят путем введения дважды в день дозы 120 мг. Указанные дозы оказались безопасными и хорошо переносимыми.

Предпочтительная схема введения также показала быструю пероральную абсорбцию с определяемыми уровнями уже через 15-30 минут после приема дозы. Уровень абсорбции может поддерживаться стабильным даже при повторном приеме, и критического накопления не наблюдается.

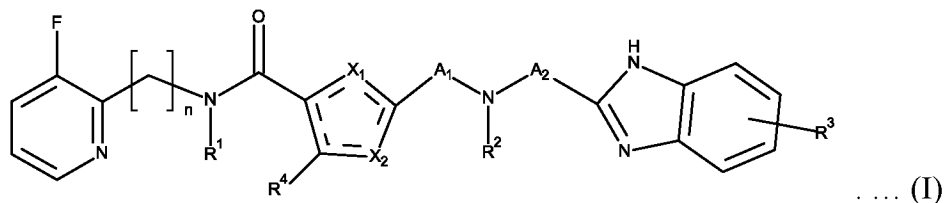
Также оказалось, что предпочтительная схема введения эффективно снижает средние уровни железа в сыворотке и среднюю расчетную насыщенность трансферрином и смещает средний пик сывороточного гепсидина, что указывает на ее эффективность для лечения TDT.

В другом аспекте изобретения начальная и одна или несколько последующих доз

регулируются в зависимости от концентрации гемоглобина у пациента, которого лечат. Концентрацию гемоглобина определяют общепринятыми методами.

Соединения ингибиторы ферропортина (Fpn)

Настоящее изобретение относится к новому медицинскому применению соединений формулы (I), определенных в настоящем документе.



в настоящем документе и во всем изобретении группы заместители имеют значения, указанные подробно где-либо в настоящем документе.

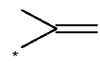
Необязательно замещенный алкил предпочтительно включает линейный или разветвленный алкил, предпочтительно содержащий 1-8, предпочтительнее 1-6, особенно предпочтительно 1-4, даже предпочтительнее 1, 2 или 3 атома углерода, и также указывается как C₁-C₄-алкил или C₁-C₃-алкил.

Необязательно замещенный алкил также включает циклоалкил, содержащий предпочтительно 3-8, предпочтительнее 5 или 6 атомов углерода.

Примеры алкильных остатков, содержащих 1-8 атомов углерода, включают метильную группу, этильную группу, н-пропильную группу, изопропильную группу, н-бутильную группу, изобутильную группу, втор-бутильную группу, трет-бутильную группу, н-пентильную группу, изопентильную группу, втор-пентильную группу, трет-пентильную группу, 2-метилбутильную группу, н-гексильную группу, 1-метилпентильную группу, 2-метилпентильную группу, 3-метилпентильную группу, 4-метилпентильную группу, 1-этилбутильную группу, 2-этилбутильную группу, 3-этилбутильную группу, 1,1-диметилбутильную группу, 2,2-диметилбутильную группу, 3,3-диметилбутильную группу, 1-этил-1-метилпропильную группу, н-гептильную группу, 1-метилгексильную группу, 2-метилгексильную группу, 3-метилгексильную группу, 4-метилгексильную группу, 5-метилгексильную группу, 1-этилпентильную группу, 2-этилпентильную группу, 3-этилпентильную группу, 4-этилпентильную группу, 1,1-диметилпентильную группу, 2,2-диметилпентильную группу, 3,3-диметилпентильную группу, 4,4-диметилпентильную группу, 1-пропилбутильную группу, н-октильную группу, 1-метилгептильную группу, 2-метилгептильную группу, 3-метилгептильную группу, 4-метилгептильную группу, 5-метилгептильную группу, 6-метилгептильную группу, 1-этилгексильную группу, 2-этилгексильную группу, 3-этилгексильную группу, 4-этилгексильную группу, 5-этилгексильную группу, 1,1-диметилгексильную группу, 2,2-

диметилгексильную группу, 3,3-диметилгексильную группу, 4,4-диметилгексильную группу, 5,5-диметилгексильную группу, 1-пропилпентильную группу, 2-пропилпентильную группу, и т.д. Группы, содержащие 1-4 атома углерода (C₁-C₄-алкил), такие как, в частности, метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, втор-бутил и трет-бутил, являются предпочтительными. Более предпочтителен C₁-C₃-алкил, в частности, метил, этил, пропил и изопропил. Наиболее предпочтительными являются C₁- и C₂-алкил, такие как метил и этил.

Циклоалкильные остатки, содержащие 3-8 атомов углерода, предпочтительно включают циклопропильную группу, циклобутильную группу, цикlopентильную группу, циклогексильную группу, циклогептильную группу и циклооктильную группу. Циклопропильная группа, циклобутильная группа, цикlopентильная группа и циклогексильная группа являются предпочтительными. Циклопропильная группа является особенно предпочтительной.

Заместители определенного выше необязательно замещенного алкила предпочтительно включают 1, 2 или 3 одинаковых или различных заместителя, выбранных, например, из группы, включающей галоген, определенный ниже, такой как, предпочтительно, F, циклоалкил, определенный выше, такой как, предпочтительно, циклопропил, необязательно замещенный гетероарил, определенный ниже, такой как, предпочтительно, бензимидазолильная группа, необязательно замещенный амино, определенный ниже, такой как, предпочтительно, аминогруппа или бензилоксикарбониламино, карбоксильную группу, аминокarbонильную группу, определенную ниже, а также алкиленовую группу, такую как, в частности, метиленовая группа, образующая, например, метилензамещенную этильную группу (CH₃-(C=CH₂)- или , причем * показывает место связывания).

В настоящем изобретении галоген включает фтор, хлор, бром и иод, предпочтительно фтор или хлор, наиболее предпочтительно представляет собой фтор.

Примеры линейного или разветвленного алкильного остатка, замещенного галогеном и содержащего 1-8 атомов углерода, включают

фторметильную группу, дифторметильную группу, трифторметильную группу, хлорметильную группу, дихлорметильную группу, трихлорметильную группу, бромметильную группу, дибромметильную группу, трибромметильную группу, 1-фторэтильную группу, 1-хлорэтильную группу, 1-бромэтильную группу, 2-фторэтильную группу, 2-хлорэтильную группу, 2-бромэтильную группу, дифторэтильную группу, такую как 1,2-дифторэтильная группа, 1,2-дихлорэтильную группу, 1,2-дибромэтильную группу, 2,2-дифторэтильную группу, 2,2-дихлорэтильную группу, 2,2-дибромэтильную группу,

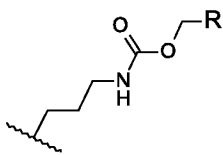
2,2,2-трифторэтильную группу, гептафторэтильную группу, 1-фторпропильную группу, 1-хлорпропильную группу, 1-бромпропильную группу, 2-фторпропильную группу, 2-хлорпропильную группу, 2-бромпропильную группу, 3-фторпропильную группу, 3-хлорпропильную группу, 3-бромпропильную группу, 1,2-дифторпропильную группу, 1,2-дихлорпропильную группу, 1,2-дибромпропильную группу, 2,3-дифторпропильную группу, 2,3-дихлорпропильную группу, 2,3-дибромпропильную группу, 3,3,3-трифторпропильную группу, 2,2,3,3,3-пентафторпропильную группу, 2-фторбутильную группу, 2-хлорбутильную группу, 2-бромбутильную группу, 4-фторбутильную группу, 4-хлорбутильную группу, 4-бромбутильную группу, 4,4,4-трифторбутильную группу, 2,2,3,3,4,4,4-гептафторбутильную группу, перфторбутильную группу, 2-фторпентильную группу, 2-хлорпентильную группу, 2-бромпентильную группу, 5-фторпентильную группу, 5-хлорпентильную группу, 5-бромпентильную группу, перфторпентильную группу, 2-фторгексильную группу, 2-хлоргексильную группу, 2-бромгексильную группу, 6-фторгексильную группу, 6-хлоргексильную группу, 6-бромгексильную группу, перфторгексильную группу, 2-фторгептильную группу, 2-хлоргептильную группу, 2-бромгептильную группу, 7-фторгептильную группу, 7-хлоргептильную группу, 7-бромгептильную группу, перфторгептильную группу и т.д. В частности, упоминаются фторалкил, дифторалкил и трифторалкил, и трифторметил, и моно- и дифторэтил являются предпочтительными. Особенно предпочтителен трифторметил.

Примеры циклоалкилзамещенной алкильной группы включают указанные выше алкильные остатки, содержащие 1-3, предпочтительно 1 циклоалкильную группу, такие как, например, циклопропилметил, циклобутилметил, циклопентилметил, циклогексилметил, 2-циклопропилэтил, 2-циклобутилэтил, 2-циклопентилэтил, 2-циклогексилэтил, 2- или 3-циклопропилпропил, 2- или 3-циклобутилпропил, 2- или 3-циклопентилпропил, 2- или 3-циклогексилпропил, и т.д. Предпочтительным является циклопропилметил.

Примеры гетероарилзамещенной алкильной группы включают указанные выше алкильные остатки, содержащие 1-3, предпочтительно 1 (необязательно замещенную) гетероарильную группу, такую как, например, пиридинил, пиридазинил, пиримидинил, пиазинил, пиазалил, имидазолил, бензимидазолил, тиофенил или оксазолильная группа, такие как пиридин-2-илметил, пиридин-3-илметил, пиридин-4-илметил, 2-пиридин-2-илэтил, 2-пиридин-1-илэтил, 2-пиридин-3-илэтил, пиридазин-3-илметил, пиримидин-2-илметил, пиримидин-4-илметил, пиазин-2-илметил, пиазол-3-илметил, пиазол-4-илметил, пиазол-5-илметил, имидазол-2-илметил, имидазол-5-илметил, бензимидазол-2-илметил, тиофен-2-илметил, тиофен-3-илметил, 1,3-оксазол-2-илметил.

Предпочтительной является алкильная группа, которая замещена бензимидазолильной группой, такая как бензимидазол-2-илметил и бензимидазол-2-илэтил.

Примеры аминозамещенного алкильного остатка включают вышеуказанные алкильные остатки, содержащие 1-3, предпочтительно 1 (необязательно замещенную) аминогруппу, определенную ниже, такую как, например, аминоалкил (NH_2 -алкил) или моно- или диалкиламиноалкил, такие как аминометил, 2-аминоэтил, 2- или 3-аминопропил, метиламинометил, метиламиноэтил, метиламинопропил, 2-этиламинометил, 3-этиламинометил, 2-этиламиноэтил, 3-этиламиноэтил и т.д., причем предпочтительным является 3-аминопропил, или алкильную группу, которая может быть замещена необязательно замещенной алкилоксикарбониламиногруппой, такой как группа



согласно формуле , в которой R обозначает фенильную группу, образующую бензилоксикарбониламинопропильную группу.

Необязательно замещенный амин согласно изобретению предпочтительно включает амино ($-\text{NH}_2$), необязательно замещенный моно- или диалкиламино (алкил- NH -, (алкил) $_2\text{N}$ -), причем относительно «алкила» можно обратиться к определению необязательно замещенного алкила, приведенному выше. Предпочтительным является моно или диметиламино, моно- или диэтиламино и монопропиламино. Наиболее предпочтительными являются аминогруппа ($-\text{NH}_2$) и монопропиламино.

Кроме того, в настоящем изобретении карбоксильная группа отображает группу [$-(\text{C}=\text{O})-\text{OH}$], и аминокарбонильная группа отображает группу [$\text{NH}_2-(\text{C}=\text{O})-$].

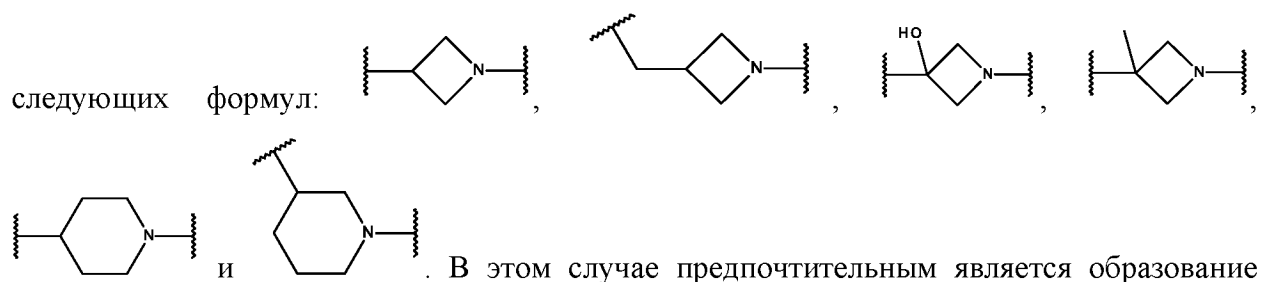
Необязательно замещенный алкокси включает необязательно замещенную алкил-О-группу, причем можно сделать ссылку на приведенное выше определение алкильной группы. Предпочтительные алкоксигруппы представляют собой линейные или разветвленные алкоксигруппы, содержащие до 6 атомов углерода, такие как метоксигруппа, этоксигруппа, н-пропилоксигруппа, изопропилоксигруппа, н-бутилоксигруппа, изобутилоксигруппа, втор-бутилоксигруппа, трет-бутилоксигруппа, н-пентилоксигруппа, изопентилоксигруппа, втор-пентилоксигруппа, трет-пентилоксигруппа, 2-метилбутоксигруппа, н-гексилоксигруппа, изогексилоксигруппа, трет-гексилоксигруппа, втор-гексилоксигруппа, 2-метилпентилоксигруппа, 3-метилпентилоксигруппа, 1-этилбутилоксигруппа, 2-этилбутилоксигруппа, 1,1-диметилбутилоксигруппа, 2,2-диметилбутилоксигруппа, 3,3-диметилбутилоксигруппа, 1-этил-1-метилпропилоксигруппа, а также циклоалкилоксигруппы, такие как

циклопентилоксигруппа или циклогексилоксигруппа. Предпочтительными являются метоксигруппа, этоксигруппа, н-пропилоксигруппа и изопропилоксигруппа. Метокси- и этоксигруппа являются более предпочтительными. Особенно предпочтительной является метоксигруппа.

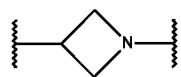
Во всем изобретении необязательно замещенный алкандиил предпочтительно представляет собой двухвалентный линейный или разветвленный алкандиильный радикал, имеющий от 1 до 6, предпочтительно от 1 до 4, предпочтительнее 1, 2 или 3 атома углерода, которые могут необязательно содержать от 1 до 3, предпочтительно 1 или 2 заместителя, выбранных из группы, включающей галоген, гидроксил (-ОН), оксогруппу (C=O; с образованием карбонильной или ацильной группы [-(C=O)-]) и алкильную группу, определенную выше, такую как предпочтительно метил. В качестве предпочтительных примеров можно упомянуть следующие группы: метилен, этан-1,2-диил, этан-1,1-диил, пропан-1,3-диил, пропан-1,1-диил, пропан-1,2-диил, пропан-2,2-диил, бутан-1,4-диил, бутан-1,2-диил, бутан-1,3-диил, бутан-2,3-диил, бутан-1,1-диил, бутан-2,2-диил, бутан-3,3-диил, пентан-1,5-диил и т.д. Особенно предпочтительными являются метилен, этан-1,2-диил, этан-1,1-диил, пропан-1,3-диил, пропан-2,2-диил и бутан-2,2-диил. Наиболее предпочтительными являются метилен, этан-1,2-диил и пропан-1,3-диил.

Предпочтительным замещенным алкандиильным радикалом является гидроксизамещенный алкандиил, такой как гидроксизамещенный этандиил, оксозамещенный алкандиил, такой как оксозамещенный метилен, или этандиильный радикал, образующий карбонильную или ацильную (ацетильную) группу, галогензамещенная алкандиильная группа, такая как алкандиильная группа, замещенная одним или двумя атомами галогена, выбранными из F и Cl, предпочтительно 2,2-дифторэтандиил, или алкандиильная группа, которая замещена метильной группой.

Согласно настоящему изобретению также возможно, что A^1 , означающий линейную или разветвленную алкандиильную группу, определенную выше, и R^2 , означающий необязательно замещенную алкильную группу, определенную выше, вместе с атомом азота, с которым они связаны, образуют необязательно замещенный 4-6-членный цикл, который может быть замещен 1-3 заместителями, определенными выше. Соответственно, A^1 и R^2 вместе могут образовать группу в соответствии с одной из



(замещенного или незамещенного) 4-членного цикла, такого как, в частности, группа



. В этом случае место связывания слева указывает место прямого связывания с гетероциклическим 5-членным циклом между положениями X^1 и X^2 в формуле (I) настоящего изобретения. Место связывания справа указывает место связывания с группой A^2 , обозначающей алкандиильную группу, имеющую значения, указанные в настоящем документе.

В формуле (I), определенной где-либо в настоящем документе, n равен целому числу от 1 до 3, включая 1, 2 или 3, указывая таким образом на метиленовую группу, этан-1,2-диильную группу или пропан-1,3-диильную группу. Предпочтительнее n равен 1 или 2, и еще предпочтительнее n равен 1, указывая на метиленовую группу.

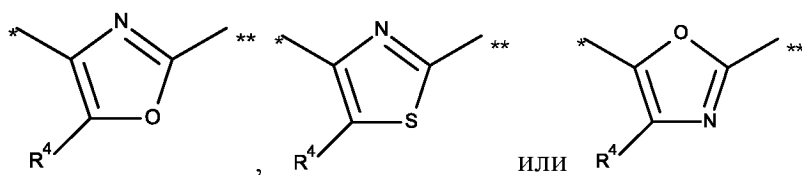
В настоящем изобретении отдельные заместители в формуле (I), приведенной выше, могут иметь значения, указанные далее.

A) X^1 представляет собой N или O; и

X^2 представляет собой N, S или O;

при условии, что X^1 и X^2 являются различными;

причем таким образом образуются 5-членные гетероциклы согласно формулам



причем * показывает место связи с аминокарбонильной группой, и ** показывает место связи с группой A^1 .

B) n равен целому числу 1, 2 или 3; предпочтительно n равен 1 или 2, предпочтительнее n равен 1.

C) R^1 выбирают из группы, состоящей из

- водорода и

- необязательно замещенного алкила (определен выше);

предпочтительно R^1 представляет собой водород или метил, предпочтительнее R^1 представляет собой водород.

D) R^2 выбирают из группы, состоящей из

- водорода и

- необязательно замещенного алкила (определен выше);

предпочтительно R^2 представляет собой водород или C_1 - C_4 -алкил, предпочтительнее R^2 представляет собой водород или метил, еще предпочтительнее R^2 представляет собой водород.

Е) R^3 показывает 1, 2 или 3 необязательных заместителя, которые можно выбрать независимо из группы, состоящей из

- галогена (определен выше),
- циано,
- необязательно замещенного алкила (определен выше),
- необязательно замещенного алкокси (определен выше), и
- карбоксильной группы (определена выше);

предпочтительно R^3 обозначает 1 или 2 необязательных заместителя, которые можно выбрать независимо из группы, состоящей из

- галогена,
- циано,
- алкила (определен выше), который может быть замещен 1, 2 или 3 атомами галогена (определенными выше),

необязательно замещенного алкокси (определен выше), и карбоксильной группы (определена выше);

предпочтительнее R^3 обозначает 1 или 2 необязательных заместителя, которые можно выбрать независимо из группы, состоящей из

- F и Cl,
- циано,
- трифторметила,
- метокси и
- карбоксильной группы;

еще предпочтительнее R^3 представляет собой водород, указывая на незамещенный концевой бензимидазолильный цикл в формуле (I).

F) R^4 выбирают из группы, состоящей из

- водорода,
- галогена (определен выше),
- C_1 - C_3 -алкила и
- галогензамещенного алкила (определен выше);

предпочтительно R^4 выбирают из группы, состоящей из

- водорода,
- Cl,
- метила, этила, изопропила и
- трифторметила;

предпочтительнее R^4 выбирают из группы, состоящей из

- водорода,

- Cl,

- метила и

- трифторметила;

предпочтительнее R^4 выбирают из группы, состоящей из

- водорода,

- Cl и

- метила;

еще предпочтительнее R^4 представляет собой водород.

G) A^1 представляет собой алкандиил;

предпочтительно A^1 представляет собой метилен или этан-1,2-диил, предпочтительнее A^1 представляет собой этан-1,2-диил.

H) A^2 представляет собой алкандиил;

предпочтительно A^2 представляет собой метилен, этан-1,2-диил или пропан-1,3-диил;

предпочтительнее A^2 представляет собой метилен или этан-1,2-диил;

еще предпочтительнее A^2 представляет собой этан-1,2-диил.

I) Или A^1 и R^2 , вместе с атомом азота, с которым они связаны, образуют необязательно замещенный 4- или 6-членный цикл, определенный выше;

причем A^1 и R^2 , вместе с атомом азота, с которым они связаны, предпочтительно образуют необязательно замещенный 4-членный цикл, определенный выше;

причем A^1 и R^2 , вместе с атомом азота, с которым они связаны, предпочтительнее образуют незамещенный 4-членный цикл (азетидинильный цикл).

Заместители соединений формулы (I) могут иметь, в частности, указанные далее значения.

n имеет любые значения согласно указанным выше в B), и остальные заместители могут иметь любые значения, указанные в A) и C) - I).

R^1 имеет любые значения согласно указанным выше в C), и остальные заместители могут иметь любые значения, указанные в A) и B) и D) - I).

R^2 имеет любые значения согласно указанным выше в D), и остальные заместители могут иметь любые значения, указанные в A) - C) и E) - H) или I).

R^3 имеет любые значения согласно указанным выше в E), и остальные заместители могут иметь любые значения, указанные в A) - D) и F) - I).

R^4 имеет любые значения согласно указанным выше в F), и остальные заместители могут иметь любые значения, указанные в A) - E) и G) - I).

A^1 имеет любые значения согласно указанным выше в G), и остальные заместители могут иметь любые значения, указанные в A) - F) и H) или I).

A^2 имеет любые значения согласно указанным выше в H), и остальные заместители могут иметь любые значения, указанные в A) - G) и I).

R^2 и A^1 имеют любые значения, указанные в I), и остальные заместители могут иметь любые значения, указанные в A) - C), E), F) и H).

В предпочтительном воплощении настоящего изобретения соединения общей формулы (I) определяются тем, что

X^1 представляет собой N или O; и

X^2 представляет собой N, S или O;

при условии, что X^1 и X^2 являются различными;

R^1 представляет собой водород;

n равен 1, 2 или 3;

A^1 представляет собой метилен или этан-1,2-диил;

A^2 представляет собой метилен, этан-1,2-диил или пропан-1,3-диил;

R^2 представляет собой водород или C_1 - C_4 -алкил;

или

A^1 и R^2 , вместе с атомом азота, с которым они связаны, образуют необязательно замещенный 4-членный цикл;

R^3 обозначает 1 или 2 необязательных заместителя, которые можно выбрать независимо из группы, состоящей из

- галогена,

- циано,

- алкила, который может быть замещен 1, 2 или 3 атомами галогена,

- необязательно замещенного алкокси и

- карбоксильной группы;

R^4 выбирают из группы, состоящей из

- водорода,

- Cl,

- метила, этила, изопропила и

- трифторметила.

В другом предпочтительном воплощении настоящего изобретения соединения общей формулы (I) определяются тем, что

X^1 представляет собой N или O; и

X^2 представляет собой N, S или O;

при условии, что X^1 и X^2 являются различными;

R^1 представляет собой водород;

n равен 1 или 2;

A^1 представляет собой метилен или этан-1,2-диил;

A^2 представляет собой метилен, этан-1,2-диил или пропан-1,3-диил;

R^2 представляет собой водород или метил;

или

A^1 и R^2 , вместе с атомом азота, с которым они связаны, образуют незамещенный 4-членный цикл;

R^3 обозначает 1 или 2 необязательных заместителя, которые можно выбрать независимо из группы, состоящей из

- F и Cl,
- циано,
- трифторметила,
- метокси и
- карбоксильной группы;

R^4 выбирают из группы, состоящей из

- водорода,
- Cl,
- метила и
- трифторметила.

В другом предпочтительном воплощении настоящего изобретения соединения общей формулы (I) определяются тем, что

X^1 представляет собой N или O; и

X^2 представляет собой N, S или O;

при условии, что X^1 и X^2 являются различными;

R^1 представляет собой водород;

n равен 1;

A^1 представляет собой метилен или этан-1,2-диил;

A^2 представляет собой метилен, этан-1,2-диил или пропан-1,3-диил;

R^2 представляет собой водород;

или

A^1 и R^2 , вместе с атомом азота, с которым они связаны, образуют незамещенный 4-членный цикл;

R^3 обозначает водород, причем таким образом образуется незамещенный концевой

бензимидазолильный цикл;

R^4 выбирают из группы, состоящей из

- водорода,

- Cl,

- метила.

В другом предпочтительном воплощении настоящего изобретения соединения общей формулы (I) определяются тем, что

X^1 представляет собой N или O; и

X^2 представляет собой N, S или O;

при условии, что X^1 и X^2 являются различными;

R^1 представляет собой водород;

n равен 1;

A^1 представляет собой метилен или этан-1,2-диил;

A^2 представляет собой метилен, этан-1,2-диил или пропан-1,3-диил;

R^2 представляет собой водород;

или

A^1 и R^2 , вместе с атомом азота, с которым они связаны, образуют незамещенный 4-членный цикл;

R^3 обозначает водород, причем таким образом образуется незамещенный концевой бензимидазолильный цикл; и

R^4 представляет собой водород.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к новым применению и способу лечения, определенным в настоящем документе, причем соединения согласно формуле (I) или их соли, сольваты, гидраты и полиморфы выбирают из соединений формулы (I), приведенной выше, в которой

$n = 1$;

$R^3 =$ водород;

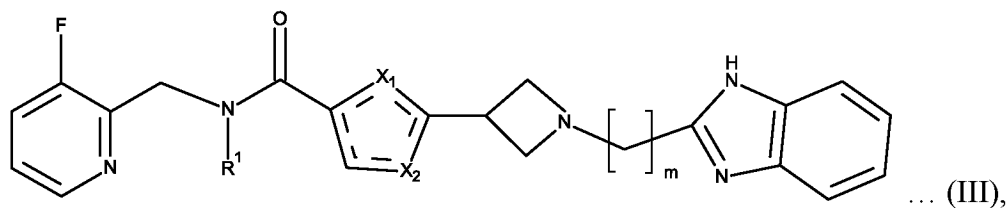
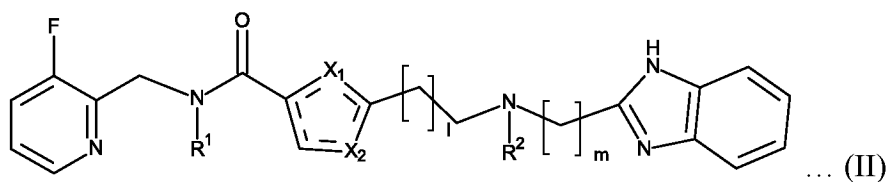
$R^4 =$ водород;

$A^1 =$ метилен или этан-1,2-диил;

$A^2 =$ метилен, этан-1,2-диил или пропан-1,3-диил;

или A^1 и R^2 , вместе с атомом азота, с которым они связаны, образуют необязательно замещенный 4-членный цикл;

образуя соединения согласно формулам (II) или (III)



причем в формуле (II) и/или (III)

l равен 0 или 1;

m равен целому числу 1, 2 или 3, и

X^1 , X^2 , R^1 и R^2 имеют значения, установленные для соединений формулы (I) где-либо в настоящем документе.

Предпочтительно в формулах (II) и (III) X^1 и X^2 имеют значения, установленные выше в А).

В формуле (II) R^1 и R^2 представляют собой предпочтительно водород.

В формуле (III) R^1 представляет собой предпочтительно водород, и m предпочтительно равен 2.

В другом предпочтительном воплощении настоящего изобретения соединения общей формулы (II) определяются тем, что

X^1 и X^2 выбирают из N и O, и они являются различными;

R^1 = водород;

R^2 = водород;

$l = 1$; и

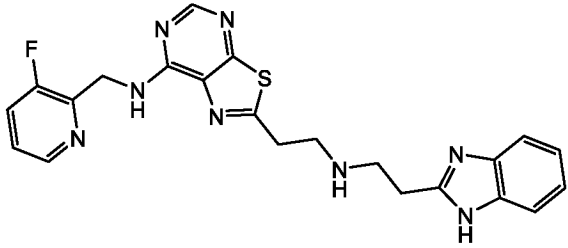
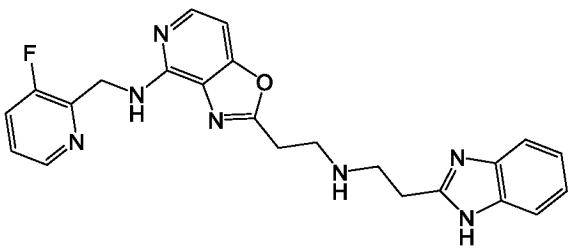
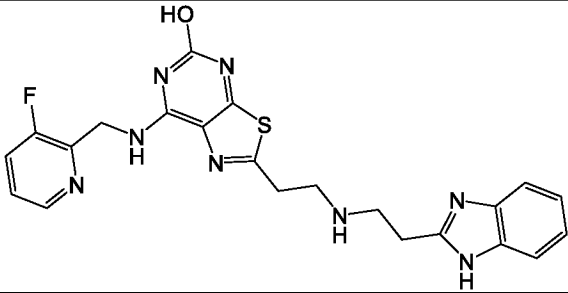
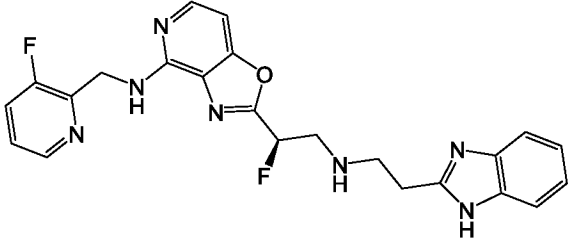
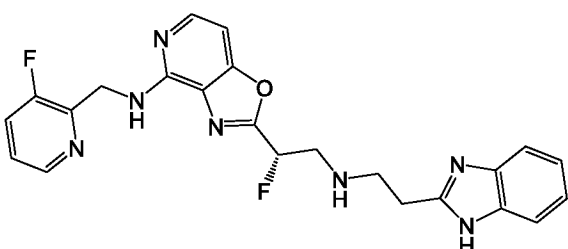
$m = 2$.

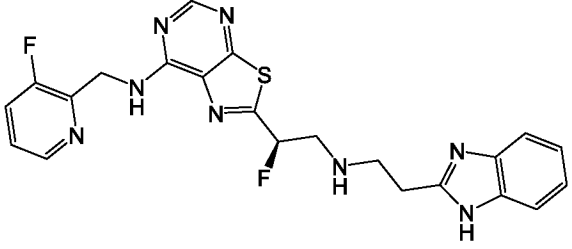
В другом предпочтительном аспекте настоящее изобретение относится к новым применению и способу лечения, определенным в настоящем документе, причем соединения согласно формуле (I) используются в форме их фармацевтически приемлемых солей или их сольватов, гидратов и полиморфов.

Что касается подходящих фармацевтически приемлемых солей соединений формул (I), (II) и (III), определенных где-либо в настоящем документе, то здесь делается отсылка к международным заявкам WO2017/068089, WO2017/08890 и, в частности, WO2018/19273. Определение фармацевтически приемлемых солей, раскрытых в этих документах, включено и в настоящий документ посредством ссылки.

Дополнительными соединениями, действующими как ингибиторы ферропортина и подходящими для лечения тяжелых форм β -талассемии, как определено в настоящем

документе, являются соединения, описанные в документе WO2020/123850 A1, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки. Конкретные соединения из числа описанных в WO2020/123850 A1, пригодные для лечения тяжелых форм β -талассемии, как определено в настоящем документе, можно быть выбрать из группы, состоящей из соединений, приведенных далее.

Структура	Наименование по ИЮПАК	Найденная масса (M+1)
	2-(2-{[2-(1H-1,3-бензодиазол-2-ил)этил]амино}этил)-N-[(3-фторпиридин-2-ил)метил]-[1,3]тиазоло[5,4-d]пиримидин-7-амин	449.2
	2-(2-{[2-(1H-1,3- бензодиазол-2- ил)этил]амино}этил)-N-[(3-фторпиридин-2-ил)метил]-[1,3]оксазоло[4,5-с]пиридин-4-амин	432.2
	2-(2-{[2-(1H-1,3- бензодиазол-2- ил)этил]амино}этил)-7-{[(3-фторпиридин-2-ил)метил]амино}-[1,3]тиазоло[5,4-d]пиримидин-5-ол	465.1
	2-[(1R)-2-{[2-(1H-1,3-бензодиазол-2-ил)этил]амино}-1-фторэтил]-N-[(3-фторпиридин-2-yl)метил]-[1,3]оксазоло[4,5-с]пиридин-4-амин	450.2
	2-[(1S)-2-{[2-(1H-1,3-бензодиазол-2-ил)этил]амино}-1-фторэтил]-N-[(3-фторпиридин-2-ил)метил]-[1,3]оксазоло[4,5- с]пиридин-4-амин	450.2

Структура	Наименование по ИЮПАК	Найденная масса (M+1)
	2-[(1R)-2-{[2-(1H-1,3-бензодиазол-2-ил)этил]амино}-1-фторэтил]-N-[(3-фторпиридин-2-ил)метил]-[1,3]тиазоло[5,4-d]пиримидин-7-амин	467

В другом предпочтительном аспекте настоящее изобретение относится к новым применению и способу лечения, определенным в настоящем документе, причем фармацевтически приемлемые соли соединений формул (I), (II) или (III) или соединений согласно WO2020/123850 A1 выбирают из солей с кислотами из группы, включающей бензойную кислоту, лимонную кислоту, фумаровую кислоту, хлороводородную кислоту, молочную кислоту, яблочную кислоту, малеиновую кислоту, метансульфоновую кислоту, фосфорную кислоту, янтарную кислоту, серную кислоту, винную кислоту и толуолсульфоновую кислоту. Предпочтительно кислоты выбирают из группы, включающей лимонную кислоту, хлороводородную кислоту, малеиновую кислоту, фосфорную кислоту и серную кислоту.

В другом предпочтительном аспекте настоящее изобретение относится к новым применению и способу лечения, определенным в настоящем документе, в которых фармацевтически приемлемые соли соединений формул (I), (II) или (III) выбирают из моносолей (соли 1:1), тройных солей (соли 1:3) и солей, характеризующихся соотношением соединения (I), (II) или (III) к кислоте 1-2:1-3; включая их сольваты, гидраты и полиморфы.

В настоящем документе соли соединений (I), (II) или (III) могут характеризоваться выбранным соотношением основание:кислота, т.е. соединение (I), (II) или (III):кислота из числа указанных выше, в диапазоне 1,0-2,0 (моль основания):1,0-3,0 (моль кислоты). В отдельном воплощении выбранное соотношение основание:кислота составляет 1,0-2,0 (моль основания):1,0-2,0 (моль кислоты).

Отдельные примеры включают следующие соотношения основание:кислота, т.е. соединение (I), (II) или (III):кислоты, указанные выше:

- 1,0 (моль основания):1,0 (моль кислоты);
- 1,0 (моль основания):1,25 (моль кислоты);
- 1,0 (моль основания):1,35 (моль кислоты);
- 1,0 (моль основания):1,5 (моль кислоты);
- 1,0 (моль основания):1,75 (моль кислоты);
- 1,0 (моль основания):2,0 (моль кислоты);

1,0 (моль основания):3,0 (моль кислоты) и

2,0 (моль основания):1,0 (моль кислоты).

в настоящем документе соотношение основание:кислота 1:1 также называется «моносоль(и)» или «соль(и) 1:1». Например, моно-HCl соль также обозначается как 1HCl или 1HCl-соль.

В настоящем документе соль, имеющая соотношение основание:кислота 1:2, также называется «дисоль(и)» или «соль(и) 1:2». Например, ди-HCl соль также обозначается как 2HCl или 2HCl-соль.

В настоящем документе соль, имеющая соотношение основание:кислота 1:3, также называется «трисоль(и)» или «соль(и) 1:3». Например, три-HCl соль также обозначается как 3HCl или 3HCl-соль.

Соль, имеющая соотношение основание:кислота 1:1,25, также называется «соль(и) 1:1,25».

Соль, имеющая соотношение основание:кислота 1:1,35, также называется «соль(и) 1:1,35».

Соль, имеющая соотношение основание:кислота 1:1,5, также называется «соль(и) 1:1,5».

Соль, имеющая соотношение основание:кислота 1:1,75, также называется «соль(и) 1:1,75».

Соль, имеющая соотношение основание:кислота 2:1, также называется «гемисоль(и)» или «соль(и) 2:1».

Соли соединений формулы (I), (II) или (III) согласно настоящему изобретению могут присутствовать в аморфной, полиморфной, кристаллической и/или полукристаллической (частично кристаллической) форме, а также в форме сольвата соли. Предпочтительно соли соединений формул (I), (II) или (III) согласно настоящему изобретению присутствуют в кристаллической и/или полукристаллической (частично кристаллической) форме и/или в форме их сольватов.

Предпочтительную кристалличность солей или сольватов солей можно определить с использованием обычных аналитических методов, в частности, таких как с использованием различных рентгеновских методов, которые позволяют проводить четкий и простой анализ солей соединений. В частности, степень кристалличности можно определить или подтвердить, используя методы порошковой рентгеновской дифракции (отражения) или используя методы порошковой рентгеновской дифракции (пропускания) (PXRD). Для кристаллических твердых тел, имеющих идентичный химический состав, различные образующиеся кристаллические решетки обобщаются термином полиморфизм.

В отношении сольватов, гидратов и полиморфов и солей с определенной кристалличностью делается отсылка к международной заявке WO2018/192973, которая включена в настоящее описание посредством ссылки.

В другом предпочтительном аспекте настоящее изобретение относится к новым применению и способу лечения, определенным в настоящем документе, причем соединения формулы (I), (II) или (III) выбирают из группы, состоящий из:

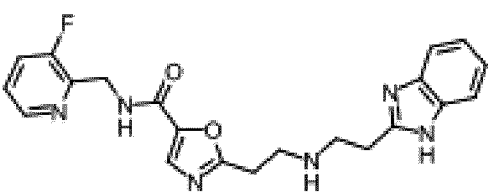
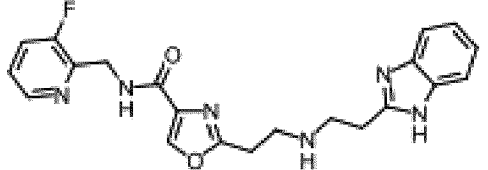
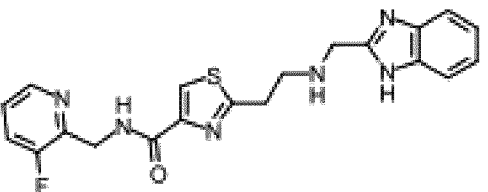
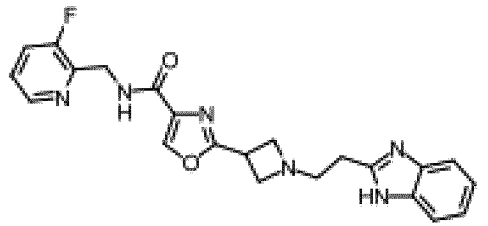
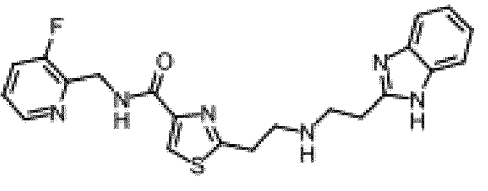
Пр. №	Структура
1	
2	
4	
40	
94	
118	

Пр. №	Структура
126	
127	
193	
206	
208	
233	

и их фармацевтически приемлемых солей, сольватов, гидратов и полиморфов.

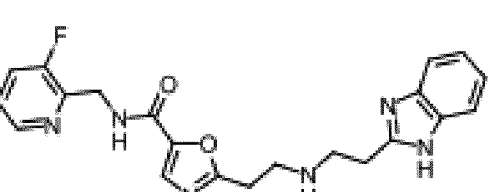
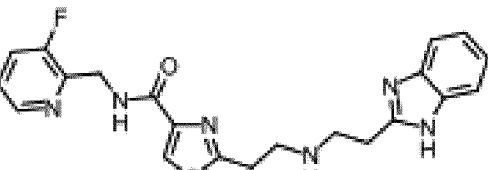
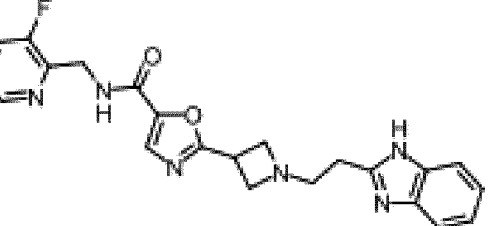
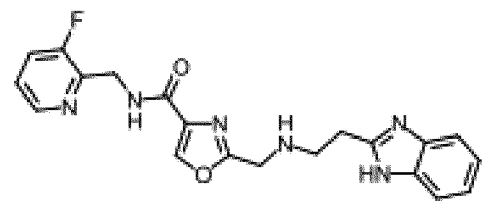
В другом предпочтительном аспекте настоящее изобретение относится к новым

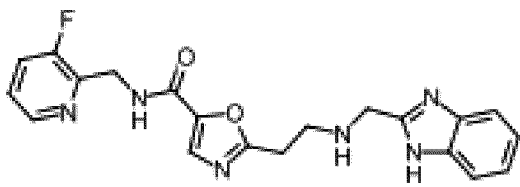
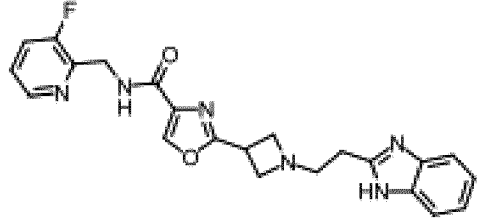
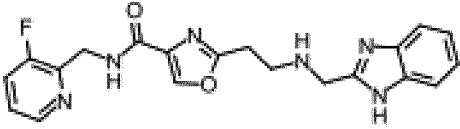
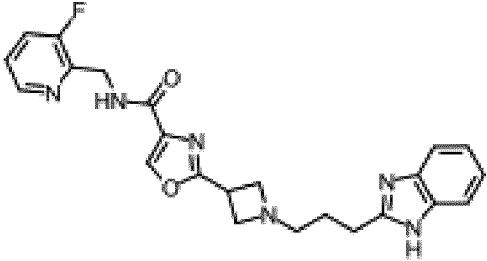
применению и способу лечения, определенным в настоящем документе, причем соединения формул (I), (II) или (III) выбирают из группы, состоящей из:

Пр. №	Структура	Пр. №	Структура
1		127	
40		208	
94			

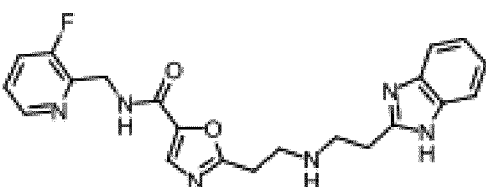
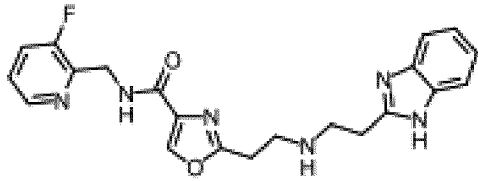
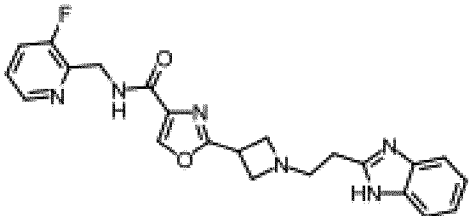
и их фармацевтически приемлемых солей, сольватов, гидратов и полиморфов.

В другом предпочтительном аспекте настоящее изобретение относится к новым применению и способу лечения, определенным в настоящем документе, причем соединения формул (I), (II) или (III) выбирают из группы, состоящей из:

Пр. №	Структура	Пр. №	Структура
1		127	
2		206	

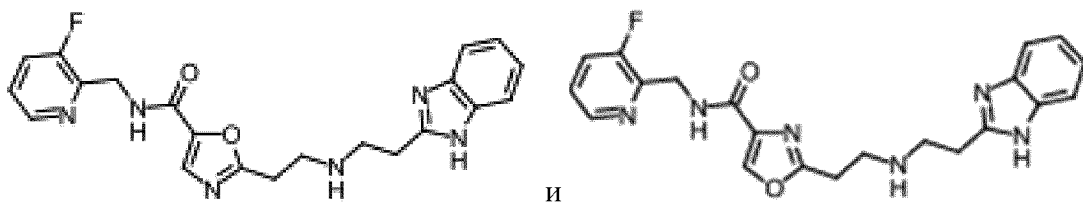
4		208	
126		233	

В другом предпочтительном аспекте настоящее изобретение относится к новым применению и способу лечения, определенным в настоящем документе, причем соединения формул (I), (II) или (III) выбирают из группы, состоящей из:

Пр. №	Структура	Пр. №	Структура
1		127	
208			

и их фармацевтически приемлемых солей, сольватов, гидратов и полиморфов.

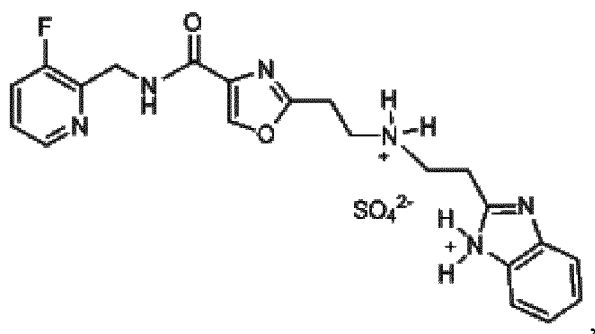
В еще более предпочтительном аспекте изобретения соединения формул (I), (II) или (III) выбирают из группы, состоящей из



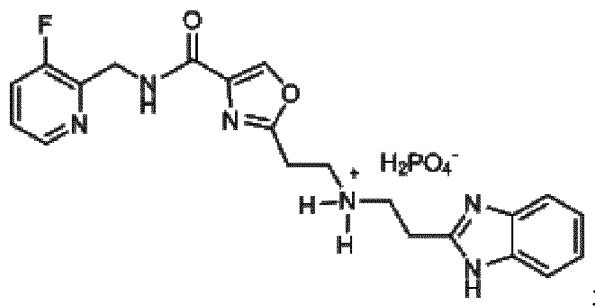
и их фармацевтически приемлемых солей, сольватов, гидратов и полиморфов.

В другом предпочтительном аспекте изобретения соединения формул (I), (II) или (III) выбирают из группы, состоящей из следующих солей:

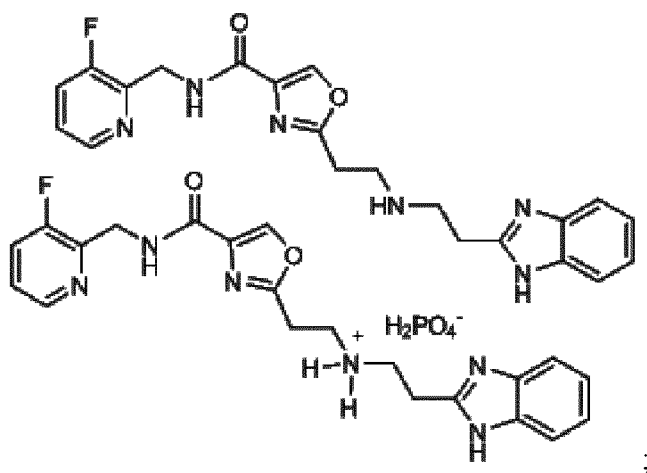
сульфат 1:1, имеющий формулу



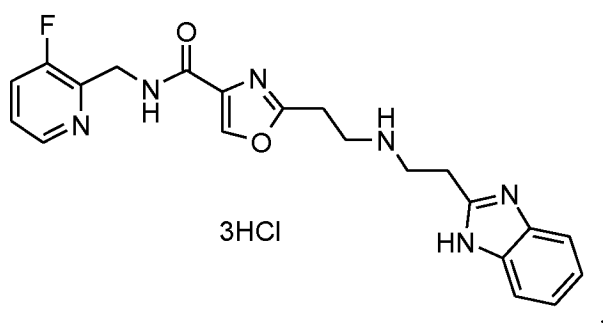
фосфат 1:1, имеющий формулу



фосфат (гемифосфат) 2:1



НСI-соль 1:3, имеющая формулу



и их полиморфы.

Как описано в WO2017/068089, WO2017/068090 и WO2018/192973, соединения формулы (I) действуют как ингибиторы ферропортина. Поэтому, относительно ингибирующей активности соединений в отношении ферропортина, делается ссылка на указанные международные заявки.

Лекарственные средства, содержащие соединения-ингибиторы ферропортина

Другой аспект изобретения относится к лекарственному средству или фармацевтической композиции, содержащей одно или несколько соединений формул (I), (II) или (III), определенных где-либо в настоящем документе, для нового применения и способа лечения тяжелых форм β -талассемии, определенных где-либо в настоящем документе.

Такое лекарственное средство может также содержать один или несколько фармацевтических носителей и/или одно или несколько вспомогательных веществ и/или один или несколько растворителей.

Предпочтительно лекарственное средство находится в форме пероральной лекарственной формы, например, такой как определенная выше.

Предпочтительно фармацевтические носители и/или вспомогательные вещества и/или растворители выбирают из соединений, подходящих для получения пероральных лекарственных форм.

Указанные фармацевтические композиции содержат, например, до 99 мас.%, или до 90 мас.%, или до 80 мас.%, или до 70 мас.% соединений ингибиторов ферропортина по настоящему изобретению, причем каждую остальную часть образуют фармакологически приемлемые носители и/или вспомогательные вещества и/или растворители и/или необязательно дополнительные фармацевтически активные соединения.

В них фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные вещества или растворители являются обычными фармацевтическими носителями, вспомогательными веществами или растворителями, включая различные органические или неорганические носители и/или вспомогательные материалы, как они обычно используются в фармацевтических целях, в частности для твердых лекарственных препаратов. Примеры включают эксципиенты, такие как сахароза, крахмал, маннит, сорбит, лактоза, глюкоза, целлюлоза, тальк, фосфат кальция, карбонат кальция; связующие агенты, такие как целлюлоза, метилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, полипропилпирролидон, желатин, гуммиарабик, полиэтиленгликоль, сахароза, крахмал; разрыхлители, такие как крахмал, гидролизованный крахмал, карбоксиметилцеллюлоза, кальциевая соль карбоксиметилцеллюлозы, гидроксипропилкрахмал, натрийгликолевый крахмал, бикарбонат натрия, фосфат кальция, цитрат кальция; лубриканты, такие как стеарат магния, тальк, лаурилсульфат натрия; корригенты, такие как лимонная кислота, ментол, глицин, апельсиновый порошок; консерванты, такие как бензоат натрия, бисульфит натрия, парабен (например, метилпарабен, этилпарабен, пропилпарабен, бутилпарабен); стабилизаторы, такие как лимонная кислота, цитрат натрия, уксусная кислота и

поликарбоновые кислоты из ряда titriplex, такие как, например, диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТРА); суспендирующие агенты, такие как метилцеллюлоза, поливинилпирролидон, стеарат алюминия; диспергирующие агенты; разбавители, такие как вода, органические растворители; воски, жиры и масла, такие как пчелиный воск, масло какао; полиэтиленгликоль; белый вазелин и т.д.

Жидкие лекарственные препараты, такие как растворы, суспензии и гели, обычно содержат жидкий носитель, такой как вода и/или фармацевтически приемлемые органические растворители. Кроме того, такие жидкие препараты могут также содержать агенты, регулирующие pH, эмульгаторы или диспергирующие агенты, буферирующие агенты, консерванты, смачивающие агенты, желатинизирующие агенты (например, метилцеллюлозу), красители и/или корригенты, например, определенные выше. Композиции могут быть изотоническими, т.е. они могут иметь такое же осмотическое давление, как кровь. Изотоничность композиции можно регулировать с использованием хлорида натрия и других фармацевтически приемлемых агентов, таких как, например, декстроза, мальтоза, борная кислота, тартрат натрия, пропиленгликоль и другие неорганические или органические растворимые вещества. Вязкость жидких композиций можно регулировать с помощью фармацевтически приемлемого загустителя, такого как метилцеллюлоза. Другие подходящие загустители включают, например, ксантановую камедь, карбоксиметилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, карбомер и т.п. Предпочтительная концентрация загустителя будет зависеть от выбранного агента.

Фармацевтически приемлемые консерванты можно использовать для увеличения срока хранения жидкой композиции. Бензиловый спирт может быть подходящим, хотя также можно использовать множество консервантов, включая, например, парабены, тимеросал, хлорбутанол и хлорид бензалкония.

Комбинированная терапия

Другая цель настоящего изобретения относится к лекарственным средствам или комбинированным препаратам, содержащим одно или несколько соединений ингибиторов ферропортина, определенных где-либо в настоящем документе, и по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное соединение («соединение для комбинированной терапии»), причем предпочтительно дополнительное активное соединение применимо при лечении тяжелой β -талассемии, как определено в настоящем документе, в частности, при лечении TDT. Предпочтительными соединениями для комбинированной терапии являются, в частности, соединения, используемые для профилактики и лечения перегрузки железом и связанных с ней симптомов. Наиболее предпочтительными соединениями для комбинированной терапии являются соединения,

хелатирующие железо, или соединения для профилактики и лечения любого из состояний, расстройств или заболеваний, сопровождающих или являющихся результатом перегрузки железом и β -талассемии. Подходящие соединения для комбинированной терапии можно выбрать из фармацевтически активных соединений для профилактики и лечения талассемии, гемохроматоза, серповидно-клеточной анемии, нейродегенеративных заболеваний (таких как болезнь Альцгеймера или болезнь Паркинсона) и связанных с ними симптомов. Предпочтительно по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное соединение для комбинированной терапии выбирают из лекарственных средств для снижения перегрузки железом (например, Tmprss6-ASO) и хелаторов железа, в частности куркумина, SSP-004184, деферитрина, деферазирокса, дефероксамина и деферипрона, а также гидроксимочевины или ингибиторов JAK2. Наиболее предпочтительным соединением для комбинированной терапии из группы соединений, хелатирующих железо, является деферазирокс.

Дополнительные предпочтительные соединения для комбинированной терапии можно выбрать из лекарственных средств для лечения β -талассемии, таких как луспатерцепт, лентиглобин BB305 (генная терапия, разработанная компанией Bluebird Bio), синтетический гепсидин человека (LJPC-401), пептидомиметик гепсидина PTG-300 и антисмысловой олигонуклеотид, нацеленный на Tmprss6 (IONIS-TMPRSS6-L RX).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к новому применению и медицинскому лечению, определенным в настоящем документе, где соединения ингибиторов ферропортина, определенные в настоящем документе, вводят пациенту, нуждающемуся в этом, в комбинированной терапии с одним или несколькими соединениями для комбинированной терапии, определенными выше, в фиксированной дозе или комбинации свободных доз для последовательного применения. Такая комбинированная терапия включает совместное введение соединений ингибиторов ферропортина, определенных в настоящем изобретении, по меньшей мере с одним дополнительным фармацевтически активным соединением (лекарственное средство/соединение для комбинированной терапии).

Комбинированная терапия при комбинированной терапии с фиксированной дозой включает совместное введение соединений ингибиторов ферропортина, определенных в настоящем документе, по меньшей мере с одним дополнительным фармацевтически активным соединением в препарате с фиксированной дозой.

Комбинированная терапия при комбинированной терапии со свободной дозой включает совместное введение соединений ингибиторов ферропортина, определенных в настоящем документе, и по меньшей мере одного дополнительного фармацевтически

активного соединения со свободными дозами соответствующих соединений либо путем одновременного введения отдельных соединений, либо путем последовательного применения отдельных соединений, распределенного по времени.

В особенно предпочтительном воплощении комбинированная терапия включает одновременное введение перорального ингибитора ферропортина, соответствующего примеру соединению № 127, описанному ниже, и хелатора железа деферазирокса.

Другое воплощение настоящего изобретения относится к комбинированной терапии, как описано выше, в которой соединение ингибитор ферропортина является соединением, выбранным среди описанных в WO2020/123850 A1, в частности, одним из конкретных примеров соединений в указанной заявке, как описано выше. Предпочтительно такая комбинированная терапия включает одновременное введение соединения ингибитора ферропортина и хелатора железа деферазирокса.

Описание фигур

Фиг. 1. Анализ методом электрофореза в ТАУ-геле мембраносвязанных глобинов в RBC мышей Hbb^{th3/+} и WT. Растворимый α - и β -гемоглобин из WT RBC показан как эталон (слева). Количественная оценка интенсивности сигнала полос α -глобина методом денситометрии (справа). Показаны существенные различия между группами обработки: *** $p < 0,001$ (односторонний ANOVA с критерием множественного сравнения Бонферрони).

Фиг. 2. Сниженные Fpn127 уровни ROS в зрелых RBC мышей Hbb^{th3/+} после 8 (A) или 15 (B) дней перорального введения 60 мг/кг дважды в день.

Фиг. 3. Масса печени (слева), общая концентрация Fe у всех животных (посередине) и общая концентрация Fe у самцов (m) и самок (f) по отдельности (справа) в печени мышей Hbb^{th3/+} и WT. Отдельные величины показаны как среднее $\pm$ SD. Показаны значимые различия по сравнению с группой Hbb^{th3/+}, обработанной средой: *** $p < 0,001$ (односторонний ANOVA с критерием множественных сравнений Даннетта).

Фиг. 4. Относительная масса селезенки (слева), общая концентрация Fe у всех животных (посередине) и общая концентрация Fe для самцов (m) и самок (f) по отдельности (справа) в селезенке мышей Hbb^{th3/+} и WT. Отдельные величины показаны со средними значениями. Показаны значимые различия по сравнению с группой, Hbb^{th3/+}, обработанной средой: *** $p < 0,001$ (односторонний ANOVA с критерием множественных сравнений Даннетта).

Фиг. 5. Масса почек (слева), общая концентрация Fe у всех животных (посередине) и общая концентрация Fe для самцов и самок по отдельности (справа) в почках мышей Hbb^{th3/+} и WT. Отдельные величины показаны со средними значениями. Показаны

значимые различия по сравнению с группой Hbbth3/+, обработанной средой: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (односторонний ANOVA с критерием множественных сравнений Даннета). Показаны значимые различия по сравнению с группой th3/+ DFX+VIT-2763: # $p < 0,05$ (односторонний ANOVA с критерием множественных сравнений Даннета).

Фиг. 6. Повышение уровней Hb в группах обработки. Hb у всех животных (вверху слева), самцов (M; внизу слева) и самок (F; внизу справа) мышей Hbb^{th3/+} с дня 1 до конца исследования. Данные приводятся как среднее $\pm$ SD. Показаны значимые различия по сравнению с группой Hbbth3/+, обработанной носителем: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (двусторонний ANOVA с критерием множественных сравнений Даннета).

Фиг. 7. Выбранные гематологические параметры у самцов и самок мышей Hbb^{th3/+} и WT в день 23. Отдельные величины показаны со средними значениями. Показаны значимые различия по сравнению с группой Hbbth3/+, обработанной носителем: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (односторонний ANOVA с критерием множественных сравнений Даннета).

Фиг. 8. Числа лейкоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов в крови самцов и самок мышей Hbb^{th3/+} и WT в день 23. Отдельные величины показаны со средними значениями. Показаны значимые различия по сравнению с группой Hbbth3/+, обработанной носителем: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (односторонний ANOVA с критерием множественных сравнений Даннета).

Фиг. 9. Анализ методом проточной цитометрии клеток селезенки на разных стадиях дифференцировки эритроидов. Эритроидные клетки идентифицируют путем окрашивания антителами против Ter119 и CD44. Различные стадии развития эритроидных клеток показаны как проценты от родительских клеток селезенки Ter119+. Отдельные величины показаны как среднее $\pm$ SD. Показаны значимые различия по сравнению с группой Hbbth3/+, обработанной носителем: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (односторонний ANOVA с критерием множественных сравнений Даннета).

Фиг. 10. Сывороточное железо, TSAT и EPO определяют в образцах сыворотки самцов и самок мышей Hbb^{th3/+} и WT, взятых через 1 час после последней дозы DFX в день 23. Отдельные величины показаны со средними значениями. Показаны значимые различия по сравнению с группой Hbbth3/+, обработанной носителем: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (односторонний ANOVA с критерием множественных сравнений Даннета).

Фиг. 11. Концентрация DFX и Fpn127 в плазме групп всех обработок, взятой через 1 час после последней дозы DFX в день 23. Отдельные величины показаны со средними значениями.

Фиг. 12. Анализ методом проточной цитометрии внутриклеточных ROS, воздействия PS (связывание аннексина V) и удержания митохондрий в цельной крови мышей Hbb^{th3/+} и WT. Процентное содержание ROS-положительных (слева), аннексин V-положительных (посередине) и митотрекер-положительных (справа) зрелых RBC показано как среднее отдельных величин $\pm$ SD. Показаны существенные различия по сравнению с группой Hbbth3/+, обработанной носителем: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (односторонний ANOVA с критерием множественных сравнений Даннета).

Фиг. 13. Влияние Fpn127 на концентрацию NTBI в плазме через 3 часа после переливания крови (BT) у мышей Hbbth3/+. Отдельные величины показаны как среднее $\pm$ SD, статистический анализ выполняют путем сравнения групп всех обработок с группой BT, обработанной носителем, с использованием одностороннего ANOVA с критерием множественных сравнений Даннетта, * $p < 0,05$, $n = 4$ мыши на группу.

На фигурах «VIT-2763» показывает испытываемое соединение Fpn127 (пример соединения № 127).

Примеры

Изобретение иллюстрируется подробнее следующими далее примерами. Примеры являются только иллюстрацией, и специалист в данной области может распространить конкретные примеры на другие соединения ингибиторы ферропортина согласно настоящему изобретению.

I. Примеры соединений ингибиторов ферропортина

Что касается получения конкретных соединений ингибиторов ферропортина примеров №№ 1, 2, 4, 40, 94, 118, 126, 127, 193, 206, 208 и 233, описанных в настоящем документе, и получения их фармацевтически приемлемых солей, то делается отсылка к международным заявкам WO2017/068089, WO2017/068090 и WO2018/192973.

Что касается получения конкретных соединений ингибиторов ферропортина, описанных в WO2020/123850 A1, отсылка делается к способам получения, описанным в международной заявке WO2020/123850 A1.

II. Фармакологические анализы

II.1. Эффективность ингибитора ферропортина соединения примера № 127 на мышинной модели TDT на основе маркеров ROS, причем мышинная модель промежуточной β -талассемии сочетается с трансфузиями

Показано, что перорально биодоступные ингибиторы ферропортина, такие как соединение на клинической стадии, соответствующее соединению примера № 127 (Fpn127), улучшают неэффективный эритропоэз, уменьшают интенсивность анемии и предотвращают нагрузку печени железом на мышинной модели β -талассемии Hbb^{th3/+}.

Ингибиторы ферропортина, такие как соединение примера № 127 на клинической стадии, также ограничивают доступность железа для образования токсичных агрегатов альфа-глобина и реактивных частиц кислорода (ROS) в предшественниках эритроидов и, таким образом, улучшают неэффективный эритропоэз. В результате большее количество ROS с увеличенной продолжительностью жизни уменьшает интенсивность анемии и улучшает насыщение тканей кислородом.

На основании этого авторы настоящего изобретения обнаружили, что описанные ингибиторы ферропортина особенно эффективны при лечении тяжелых форм β -талассемии, в частности, трансфузионно-зависимой талассемии (TDT). Пациенты с TDT имеют сильную перегрузку железом из-за регулярных переливаний крови (BT). BT вызывает временное повышение гепсидина, который возвращается к базовым величинам, когда понижаются уровни гемоглобина (Hb) (*Pasricha SR, et al., „Transfusion suppresses erythropoiesis and increases hepcidin in adult patients with beta-thalassemia major: a longitudinal study”. Blood, 2013; 122(1), 124-33*). Предотвращение всасывания железа в кишечнике ингибиторами ферропортина в интервалах между переливаниями помогает снизить дальнейшую нагрузку железом у пациентов с TDT. Более важно, что BT генерирует не связанное с трансферрином железо (NTBI), которое высвобождается макрофагами, перерабатывающими поврежденные RBC, и запускает окислительный стресс и повреждение сосудов (*Baek JH et al., “Iron accelerates hemoglobin oxidation increasing mortality in vascular diseased guinea pigs following transfusion of stored blood”. JCI Insights, 2017, 2(9)*). Кроме того, у пациентов с талассемией на регулярном BT и хелатной терапии повышены уровни NTBI, что коррелирует с наличием сердечного заболевания (*Piga A, et al., “High nontransferrin bound iron levels and heart disease in thalassemia major”, Am. J. Hematol., 2009; 84(1):29-33*).

В настоящее время обнаружено, что пероральные ингибиторы ферропортина согласно настоящему изобретению, такие как ингибитор ферропортина соединение примера № 127, обладают потенциалом для предотвращения этих вредных эффектов путем связывания железа в макрофагах и, следовательно, прерывания порочного замкнутого круга при β -талассемии. Благодаря благоприятным эффектам, которые достигаются при терапии с ингибированием ферропортина, на уровни гемоглобина, уровни NTBI и уровни LPI у пациентов с TDT, соединения ингибиторы ферропортина по настоящему изобретению обладают потенциалом для снижения количества трансфузируемых единиц RBC и таким образом снижения бремени трансфузий для пациентов с TDT.

В качестве стандарта медицинской помощи пациентам с TDT обязательно

включают регулярную ВТ. С помощью трансфузии мышинной модели в настоящем примере можно определить благоприятные действия соединений ингибиторов ферропортина по настоящему изобретению при лечении TDT с использованием биомаркеров на недавно разработанной мышинной модели β -талассемии в комбинации с переливаниями крови.

Эффективность ингибиторов ферропортина можно проверить с использованием в качестве соединения ингибитора ферропортина соединения примера № 127 (Fpn127). Это соединение ингибитор ферропортина можно ввести перорально модифицированной мышинной $Hbb^{th3/+}$ модели промежуточной β -талассемии, которую комбинируют с новым режимом переливаний крови с использованием биомаркеров для оценки эффективности лекарственного средства, предоставляя таким образом мышиную модель β -талассемии для переливания. В этом случае самок и самцов мышей $Hbb^{th3/+}$ ($n=5$ на пол) в возрасте от 8 до 12 недель распределяют по следующим группам исследования (таблица 1):

Таблица 1. Группы исследования, линии мышей и схема обработки.

Группа исследования		Линия мышей	Fpn127 (1 мг/мл) или носитель	ВТ
1.	$Hbb^{th3/+}$ / носитель	$Hbb^{th3/+}$	Носитель	Нет
2.	$Hbb^{th3/+}$ / Fpn127	$Hbb^{th3/+}$	Fpn127	Нет
3.	$Hbb^{th3/+}$ / носитель / ВТ	$Hbb^{th3/+}$	Носитель	Да
4.	$Hbb^{th3/+}$ / Fpn127 / ВТ	$Hbb^{th3/+}$	Fpn127	Да
5.	C57BL/6 / носитель	C57BL/6	Носитель	Нет

$Hbb^{th3/+}$ - мыши с талассемией; C57BL/6 – мыши дикого типа; ВТ- переливание крови

Мышей адаптируют к железосодержащей диете с содержанием железа <10 мг/кг в течение 3 дней до начала исследования. В день 1 мыши получают или носитель или Fpn127 (1 мг/мл) в композиции с питьевой водой в присутствии 0,5 мМ $^{58}\text{Fe(II)SO}_4$, 10 мМ аскорбиновой кислоты и 1% глюкозы. Добавление стабильного изотопа ^{58}Fe в питьевую воду позволяет различать пищевое железо, поглощенное до или во время исследования. В питьевую воду группы носителя добавляют 0,5 мМ $^{58}\text{Fe(II)SO}_4$, 10 мМ аскорбиновой кислоты и 1% глюкозы. Мыши имеют свободный доступ к корму и питьевой воде в течение всего исследования (6 недель). Кроме того, мыши из групп 3 и 4 получают трансфузию RBC (300 мкл крови) от трансгенных мышей-доноров C57BL/6 с зеленым флуоресцентным белком (GFP) ((C57BL/6-Tg(UBC-GFP) 30SCHA/J, Jackson Laboratories, Stock # 004353)), как опубликовано ранее (Casu C. et al., “Short-term administration of JAK2 inhibitors reduces splenomegaly in mouse models of β -thalassemia intermedia and major”, *Haematologica*, 2017). Мыши из групп 3 и 4 получают ВТ в дни 14 и 28 в зависимости от уровней Hb и количества GFP-RBC донора.

Используют указанные далее критерии для определения необходимости в

дополнительной ВТ.

- Если на 14-й день средние уровни Hb в группе 3 (Hbb^{th3/+}/ носитель / ВТ) близки к величинам в группе 1 (Hbb^{th3/+}/ носитель) таким образом, что статистическое различие (t-критерий) не обнаруживается путем сравнения средних величин группы 1 и 3, в день 14 будет проведена вторая ВТ. Та же процедура применяется и к третьей ВТ, которая может состояться в день 28.

- Если средние уровни Hb в группе 3 статистически отличаются (выше) от величин в группе 1, ВТ в день 14 проводиться не будет. В таком случае уровень Hb в группах 1 и 3 будет измерен в день 21, и может быть проведена вторая ВТ в случае, если величины Hb в группах 1 и 3 статистически значимо не различаются.

Количество донорских GFP-RBC оценивают методом проточной цитометрии в соответствии с обычными методами в день 1 (после первой ВТ), затем еженедельно перед ВТ и в конце исследования.

Сывороточный гепсидин оценивают в соответствии с обычными методами с интервалом в две недели перед ВТ в качестве показателя предотвращения всасывания железа в кишечнике ингибитором ферропортина во время интервалов между ВТ и снижения нагрузки железом у мышей Hbb^{th3/+}.

В конце исследования (д.42) мышей анализируют на ряд гематологических параметров, включая сывороточное железо, NTBI, LPI, эритропоэтин, TSAT, Hb, общий анализ крови, массу селезенки и печени, эритропоэз в селезенке и костном мозге, содержание железа в селезенке и печени и агрегаты альфа-глобина в мембранах RBC, используя методы, описанные ниже.

В качестве конкретного биомаркера для оценки эффективности ингибиторов ферропортина, например, Fpn127, в присутствии или в отсутствие ВТ используется количественное определение агрегатов альфа-глобина в RBC. Осажденные агрегаты альфа-глобина содержат гем и железо, которые генерируют реактивные частицы кислорода (ROS), что приводит к сокращению продолжительности жизни RBC, анемии и гипоксии тканей.

II-2. Снижение образования агрегатов альфа-глобина в RBC мышей Hbb^{th3/+}

Обнаружение и определение количества α -глобина, связанного с мембранами эритроцитов

Собирают свежие образцы EDTA-кровь с кровью мышей из каждой группы (кровь 2 мышей/пул), лизируют, и экстрагируют мембранные липиды как описано ранее (Sorensen S, Rubin E, Polster H, Mohandas N, Schrier S., "The role of membrane skeletal-associated alpha-globin in the pathophysiology of beta-thalassemia". Blood, 1990, Mar

15;75(6):1333-6). Нерастворимую мембранную фракцию отделяют электрофорезом в гелях с тритоном и мочевиной, подкисленной уксусной кислотой (TAU), и визуализируют окрашиванием кумасси (*Alter B. et al., Br. J. Haematol., 44:527, 1980*). Интенсивность сигнала полос α -глобина определяют количественно методом денситометрии с использованием анализатора изображений LAS-4000 с программным обеспечением Multi Gauge v.3 (GE Healthcare Life Sciences).

Анализ агрегатов альфа-глобина методом электрофореза в TAU-геле показывает значительное дозозависимое снижение уровней токсичных агрегатов α -глобина/гема в препаратах каркаса мембраны RBC животных $Hbb^{th3/+}$, обработанных Fpn127, по сравнению с животными $Hbb^{th3/+}$, обработанными носителем (фиг. 1).

II.3 Уменьшение доли ROS^+ RBC у мышей $Hbb^{th3/+}$

Влияние ингибитора ферропортина, например, Fpn127, на уровни ROS в донорских GFP-RBC можно контролировать с помощью коммерчески доступного ROS-чувствительного датчика с излучением в дальней красной области.

В отсутствие ВТ Fpn127 снижает уровни ROS в RBC мышей $Hbb^{th3/+}$ на день 8 перорального введения соединения (фиг. 2A). Уровни ROS еще снижаются после 15 дней обработки (фиг. 2B). Такие данные указывают, что ингибиторы ферропортина по настоящему изобретению, такие как Fpn127, оказывают относительно быстрое действие на эритропоэз у мышей $Hbb^{th3/+}$, и, таким образом, уровни ROS в RBC можно использовать в качестве подходящего биомаркера для оценки эффективности ингибиторов ферропортина на новой мышинной модели $Hbb^{th3/+}$ в сочетании с ВТ, как описано в настоящем документе.

II.4 Влияние Fpn127 на уровни NTBI и LPI у мышей $Hbb^{th3/+}$

Как описано выше, ВТ при TDT ведет к повышенным уровням NTBI в плазме в результате опосредованного ферропортином экспорта железа из макрофагов, перерабатывающих поврежденные RBC (*Piga A. et al., Am. J. Hematol., 2009*). Дозирование ингибиторов ферропортина, таких как Fpn127, в комбинации с ВТ имеет потенциал для снижения уровней NTBI (и LPI) в плазме и связанных с ними вредных эффектов.

Fpn 127 предотвращает высвобождение не связанного с трансферрином железа (NTBI), генерируемого ВТ, у мышей $Hbb^{th3/+}$

Для того, чтобы установить кинетику генерации NTBI у мышей $Hbb^{th3/+}$ (B6.129P2-Hbb-b1tm1Unc Hbb-b2tm1Unc/J, #002683) после переливания крови (ВТ), проводят пилотные эксперименты. В качестве доноров крови для переливания используют однопометных животных $Hbb^{th3/+}$ дикого типа (WT). Собирают периферическую кровь у терминально анестезированных мышей WT ретроорбитальным путем от 3-5 самок мышей,

семь частей крови смешивают с одной частью 14% цитратфосфатдекстрозаденина и хранят при 4°C до переливания (24 часа или 15 дней). Донорскую кровь перед переливанием предварительно нагревают до 37°C. Мыши Hbb th3/+ в возрасте 12 недель получают однократную пероральную дозу Fpn 127 в 120 мг/кг массы тела или носитель (0,5% раствор метилцеллюлозы в ddH₂O). Через тридцать минут после введения дозы мышам переливают 0,2 мл WT крови путем инъекции в хвостовую вену. Группу обработанных носителем мышей Hbb th3/+, не получающих ВТ, используют в качестве контроля без переливания. Кровь у мышей, подвергнутых терминальной анестезии, собирают через 3 часа после ВТ.

NTBI измеряют в образцах мышинной плазмы анализом на основе Fe-нитрилотриацетата (NTA), адаптированным из протокола, опубликованного Gosriwatana I. et al., 1999 (Quantification of non-transferrin-bound iron in the presence of unsaturated transferrin. Gosriwatana I, Loreal O, Lu S, Brissot P, Porter J, Hider RC. Quantification of non-transferrin-bound iron in the presence of unsaturated transferrin. *Anal. Biochem.*, 1999, Sep 10;273(2): 212-20. Во-первых готовят 800 мМ раствор тринатрия нитрилотриуксусной кислоты (NTA) (Sigma, 72565) и 800 мМ раствор динатрия NTA (Sigma, N0128), затем их смешивают и получают раствор с pH 7,0. Во-вторых, инкубируют 90 мкл растворов плазмы (полученных в гепарине) с 10 мкл 800 мМ раствора NTA в течение 30 минут при комнатной температуре. Во время инкубации NTA хелатирует не связанное с белком железо (NTBI), образуя комплексы Fe-NTA, без влияния на железо, связанное с трансферрином. Тем временем, центрифужные фильтры (Amicon Ultracel 10kda, Merck UFC501096) предварительно промывают 0,5 мл 10 мМ NTA (разбавление 1:80 800 мМ раствора NTA) и центрифугируют при 10000 g в течение 10 минут с последующими двумя стадиями промывки деионизованной водой и удаляя вращением при 10000 g в течение 10 минут каждый раз. После инкубации образцы переносят на фильтры и центрифугируют при 10000 g в течение 1 часа при t 4°C. Для измерения Fe-NTA на основе колориметрического анализа получают 60 мМ раствор батофенантролиндисульфоновой кислоты (BDA, Sigma, 146617) и 120 мМ раствор тиогликолевой кислоты (TGA, Sigma, T6750-100 мл) и затем смешивают вместе в соотношении 1:1. Получают стандартные кривые с помощью серийных разведений 10 мМ исходного раствора Fe-NTA в деионизованной воде (50 – 10 – 5 – 2,5 – 1,25 – 0,625 - 0 мкМ). Исходный раствор Fe-NTA получают предварительно путем смешивания 2 ммоль (0,550 г) тринатрия NTA (Sigma, 72565) и 1 ммоль (0,270 г) гексагидрата хлорида железа (III) (Sigma, 31234) в 100 мл 1 мМ HCl. Ультрафильтрованные образцы по 60 мкл или по 60 мкл стандартов железа смешивают с 30 мкл раствора BDA-TGA в 96-луночном планшете. После 30-минутной

инкубации при комнатной температуре образцы измеряют с помощью планшет-ридера (Biotec) при 537 нм.

Мыши $Hb^{bth3/+}$, которым перелили кровь, показывают более высокие уровни NTBI в плазме через 3 часа после переливания (фиг. 13) по сравнению с контрольными животными, которым не переливали кровь и вводили только носитель. Интересно, что введение Fpn 127 предотвращает увеличение NTBI в кровообращении после переливания, что предполагает, что ингибирование ферропортина может защитить мышей $Hb^{bth3/+}$ от перегрузки железом, вызванной переливанием крови.

В другом ряду экспериментов уровни NTBI у мышей $Hbb^{th3/+}$ в отсутствие ВТ исследуют у мышей $Hbb^{th3/+}$, обработанных или носителем, или ингибиторами ферропортина по настоящему изобретению, такими как Fpn127, в течение 6 недель. Используют с небольшими модификациями метод нитрилотриацетат-NTBI (NTA-NTBI), описанный ранее (*Singh S, Hider RC, Porter JB*". *A direct method for quantification of non-transferrin-bound iron*". *Anal. Biochem.*, 1990, May 1; 186(2): 320-3).

Вкратце, 0,02 мл 800-мМ NTA (при pH 5,7) добавляют к 0,18-мл пулу мышинной сыворотки и оставляют стоять на 30 минут при 22°C. Раствор подвергают ультрафильтрации с использованием устройств для ультрацентрифугирования Whatman Vectaspin (30 кДа) при 12320 g, и ультрафильтрат (0,02 мл) впрыскивают непосредственно в колонку для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ChromSpher-ODS, 5 мкМ, 100 × 3 мм, стеклянная колонка, снабженная соответствующей защитной колонкой), уравновешенную 5% ацетонитрилом и 3-мМ деферипроном (DFP) в 5-мМ MOPS (pH 7,8). Затем комплекс NTA-железо обменивают с образованием комплекса DFP-железо, детектируемого при 460 нм с помощью фотодиодной матрицы Waters 996. Впрыскивание стандартных концентраций железа, полученных в 80-мМ NTA, используют для получения стандартной кривой. Раствор NTA 800 мМ, используемый для обработки образцов и получения стандартов, обрабатывают 2 мкМ железа для нормализации фонового железа, которое загрязняет реагенты. Это означает, что нулевой стандарт дает положительный сигнал, поскольку он содержит добавленное фоновое железо в виде комплекса с NTA. Когда в сыворотке присутствует ненасыщенный трансферрин, это дополнительное фоновое железо может быть передано в свободные сайты трансферрина, приводя к потере фонового сигнала и получению отрицательной величины NTBI.

NTBI также измеряют с использованием другого метода анализа (CP851 гранула-NTBI), как описано в *Garbowski MW, Ma Y, Fucharoen S, Srichairatanakool S, Hider R, Porter JB*., "Clinical and methodological factors affecting non-transferrin-bound iron values using a novel fluorescent bead assay". *Transl. Res.*, 2016). Стандарты для этого анализа

получают следующим образом: 1-мМ комплекс железо-NTA (молярное соотношение 1:2,5), полученный из 100-мМ NTA и 18-мМ стандартного раствора железа для атомно-абсорбционного анализа, разбавляют водой MilliQ до конечной концентрации от 0 до 100 мкМ. Для стандартной кривой 120 мкл суспензий шариков, меченных зондом, инкубируют с 20 мкл забуференных растворов NTA-железа известной концентрации в течение 20 минут при комнатной температуре с последующим добавлением 20 мкл контрольной сыворотки от мышей дикого типа (без свободного железа) и 40 мкл параформальдегида (10% в MOPS) при конечной концентрации 2%. Суспензии в герметично закрытых 96-луночных планшетах инкубируют при 37°C в течение 16 часов при встряхивании перед измерением флуоресценции методом проточной цитометрии. Для образцов сыворотки с неизвестными концентрациями железа гранулы в количестве 140 мкл инкубируют с 20 мкл образцов сыворотки в течение 20 минут с последующим добавлением 40 мкл параформальдегида при конечной концентрации 2%. Хелатирующие флуоресцентные шарики смешивают с сывороткой мышей дикого типа в качестве контроля, чтобы установить флуоресценцию на 100%, и соответственно рассчитывают относительную флуоресценцию хелатирующих флуоресцентных шариков с сывороткой мышей Hb^{th3/+}. Измерения выполняют на проточном цитометре Beckman Coulter FC500, а анализ с программным обеспечением FlowJo. Бреша основаны на точечных графиках популяций необработанных шариков. Медианную флуоресценцию 10000 событий записывают и корректируют на автофлуоресценцию шариков. Стандартную кривую строят с помощью сигмоидальной функции зависимости от дозы с переменным наклоном.

NTBI, которое охватывает все формы сывороточного железа, которое не связано тесно с трансферрином, является химически и функционально гетерогенным. LPI представляет собой компонент NTBI, который является как редокс-активным, так и хелатором, способным проникать в органы и вызывающим перегрузку железом тканей. Анализ LPI (*Esposito BP1, Breuer W, Sirankapracha P, Pootrakul P, Hershko C, Cabantchik ZI. "Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation". Blood, 2003*) измеряет специфическую для железа способность данного образца продуцировать ROS и рассматривает один из наиболее релевантных видов реактивного железа, вовлеченных в патологическую перегрузку железом.

Набор FeROS™ LPI (Aferrix Ltd.) используют для измерения LPI в сыворотках мышей Hbb^{th3/+}, обработанных или носителем, или ингибиторами ферропортина по настоящему изобретению, такими как Fpn127, в течение 6 недель в присутствии или в отсутствие ВТ.

Обнаружено, что уровни NTBI и LPI у мышей Hbb^{th3/+}, получающих ВТ, служат

трансляционными маркерами, позволяющими оценить эффективность пероральной терапии ингибиторами ферропортина.

Такую модель также можно использовать для оптимальной разработки схемы приема ингибиторов ферропортина (таких как, например, Fpn127) для пациентов с TDT. Таким образом, с использованием комбинации переливания крови (BT) и перорального введения ингибиторов ферропортина можно установить оптимальную комбинированную терапию TDT.

С помощью моделей и примеров, описанных выше, можно продемонстрировать способность перорально вводимых ингибиторов ферропортина снижать трансфузионную нагрузку и уменьшать вредные побочные эффекты трансфузионно-зависимой β -талассемии.

III. Определение агрегатов альфа-глобина в RBC

Образцы крови промывают три раза охлажденным льдом DPBS в присутствии 1 mM ЭДТК и лизируют в охлажденном льдом гипотоническом буфере для лизиса (5 mM фосфат натрия, pH 7,6, содержащий полный коктейль ингибитора ультрапротеазы, Roche). Собирают растворимый Hb для использования в качестве стандарта в геле. «Тени» эритроцитов дополнительно промывают три раза путем ресуспендирования в гипотоническом буфере для лизиса и центрифугирования при $21000 \times g$. Мембранные липиды экстрагируют 50 mM боратом натрия, pH 8, 1 mM ЭДТК, 0,5% тритоном X-100 (Sigma-Aldrich) и ингибиторами протеазы. После последнего 30-мин центрифугирования при $30000 \times g$ супернатант полностью удаляют и нерастворимый в тритоне осадок, соответствующий мембранным цитоскелетам, быстро замораживают. Полиакриламидный гель TAU (12% акриламида / 0,08% бисакриламида (60:0,4% акриламид/бисакриламид, Bio-Rad Laboratories), 5% уксусной кислоты, 6 M мочевины (оба от Sigma-Aldrich) и 1% тритон X-100 отливают и заливают в стандартной установке вертикального электрофореза с двойным охлаждением SE660 (Hoefler).). После полимеризации гель предварительно подвергают электрофорезу 3,5 час при 140 В с анодом сверху в 5% уксусной кислоте и затем еще в течение 3 час при 200 В с гелем, покрытым раствором поглотителя (1 M цистамина, Sigma-Aldrich, 2,5 M мочевины, 5% уксусной кислоты). Мембранные цитоскелеты растворяют в 100 мкл буфера для образцов TAU (6 M мочевины, 5% уксусной кислоты, 5% β -меркаптоэтанола и 0,02% пиронина Y (оба от Sigma-Aldrich) и загружают по 20 мкл на лунку. Образцы подвергают электрофорезу в течение ночи при постоянном токе 200 В, и гель окрашивают кумасси бриллиантовым синим G-250.

IV. Трансфузионная нагрузка

Трансфузионную нагрузку у субъекта, которого лечат согласно способам

настоящего изобретения, можно оценить путем определения потребности пациента в трансфузии, например, посредством требуемого количества и/или частоты трансфузии красных клеток крови, с помощью обычной и клинически подтвержденной оценки.

V. Уровни железа

Уровни железа, такие как, например, уровни железа в печени или миокарде, можно определить с использованием обычного анализа (анализов). Например, уровни железа (например, концентрацию железа в печени или концентрацию железа в миокарде) можно определить с помощью магнитно-резонансной томографии.

VI. Определение уровня сывороточного ферритина

Уровни сывороточного ферритина можно определить с использованием обычного анализа (анализов).

VII. Эритроидный ответ

Продолжительность эритроидного ответа можно вычислить для субъекта, который демонстрирует ответ, с использованием следующего далее алгоритма.

Первый день ответа = первый день первого 12-недельного интервала, демонстрирующего ответ.

Последний день ответа = последний день последнего последовательного 12-недельного интервала, демонстрирующего ответ.

Дата последней оценки = или дата последнего посещения для субъектов, все еще принимающих препарат, или дата прекращения для субъектов, прекративших лечение.

Продолжительность эритроидного ответа можно вычислить следующим образом, в зависимости от того, заканчивается ли ответ до даты последней оценки или нет:

1) субъект, ответ которого не продолжается до конца периода лечения, продолжительность ответа не «обрезается» и вычисляется как

продолжительность ответа = последний день ответа – первый день ответа + 1;

2) субъект, у которого продолжает проявляться эритроидный ответ в конце периода лечения, дата окончания ответа «обрезается», и продолжительность ответа вычисляется как

продолжительность ответа = дата последней оценки ответа – первый день ответа + 1.

Время до первого эритроидного ответа можно вычислить следующим образом:

день от первой дозы исследуемого лекарства до первого дня начала ответа будет вычисляться с использованием:

время до ответа = первый день ответа – дата первого исследования лекарства + 1.

VIII. Определение гемоглобина

Уровни гемоглобина можно определить с использованием обычного анализа (ов).

IX. Качество жизни

Оценку качества жизни можно оценить с использованием краткой формы (36) Health Suvey (SF-26) и/или можно использовать функциональную оценку терапии рака-анемии (FACT-An), как описано, например, в WO2016/183280.

X. Эффективность ингибитора ферропортина VIT-2653 (соединение примера № 40) для ослабления железа в плазме, окислительного стресса и повреждения почек после переливания красных клеток крови у морских свинок

Эффективность соединений ингибиторов ферропортина по настоящему изобретению при лечении TDT подтверждают дополнительно результаты *J. H. Baek et al., "Ferroportin inhibition attenuates plasma iron, oxidant stress, and renal injury following red blood cell transfusion in guinea pigs"; Transfusion, 2020, Mar; 60(3): 513-523.*

Указанные эксперименты проведены путем внутривенного введения низкомолекулярного ингибитора ферропортина VIT-2653, соответствующего соединению примера № 40 настоящего изобретения, и дополнительно подтверждают выводы настоящего изобретения.

Уровни NTBI и Hb после обменной трансфузии значительно улучшаются при дозировании ингибитора ферропортина.

Также путем введения ингибитора ферропортина можно снизить общее содержание железа в почках после трансфузии. Оценка вклада циркулирующего Hb в нагрузку почек железом и последующее воздействие на окислительный стресс и повреждение клеток показывает, что введение ингибитора ферропортина морским свинкам с перелитой кровью значительно уменьшает проявление изменений креатинина плазмы > 0,3 мг/дл, показателя, который используется в качестве индикатора раннего острого повреждения почек (AKI).

Детали эксперимента и условия исследования, а также конкретные результаты исследования можно получить из упомянутой статьи.

XI. Комбинированная терапия с ингибитором ферропортина соединением примера № 127 (Fpn127) и деферазироксом на мышинной модели β -талассемии

XI.1. Введение

Как объяснялось выше, лечение перегрузки железом с помощью хелатной терапии стало основным направлением в традиционном лечении β -талассемии и, в частности, при лечении ее тяжелых форм, таких как TDT. Однако хелатирование железа не нацелено на лежащие в основе механизмы заболевания. Показано, что коррекция несбалансированной

абсорбции железа путем индукции синтеза гепсидина или добавления миметиков гепсидина нормализует разрегулированный метаболизм железа при β -талассемии (Casu C, et al., Blood, 2018). Показано, что ограничение доступности железа ингибитором ферропортина соединением №. 127 (ингибитор Fpn № 127; Fpn127) ослабляет интенсивность анемии и улучшает нарушенный гомеостаз железа у мышинной модели $Hbb^{th3/+}$ промежуточной β -талассемии (Manolova V, et al., “Oral ferroportin inhibitor ameliorates ineffective erythropoiesis in a model of β -thalassemia”, JCI, 2019). Так как многие пациенты с β -талассемией проходят хелатную терапию, авторы настоящего изобретения исследовали, вызывает ли одновременное применение обычного хелатора железа деферазирокса (DFX) и Fpn127 какие-либо терапевтические взаимодействия у мышинной модели $Hbb^{th3/+}$ промежуточной β -талассемии и его потенциал в соответствующей комбинированной терапии согласно настоящему изобретению.

XI.2. Выбор системы испытаний мышинной модели

Гетерозиготные мыши $Hbb^{th3/+}$ отображают фенотип, близко повторяющий трансфузионно независимую β -талассемию у пациентов, характеризующихся неэффективным эритропозом, анемией, спленомегалией и перегрузкой органов железом. В некоторых опубликованных исследованиях с использованием мышинной модели $Hbb^{th3/+}$ с использованием экспериментальных лекарств, индуцирующих эндогенный гепсидин или агонисты гепсидина, показано, что ограничение железа путем ингибирования Fpn в комбинации с хелатированием железа является допустимым подходом для уменьшения перегрузки железом и улучшения анемии у мышей $th3/+$ (Schmidt PJ, et al., Am. J. Hematol. 2015; Casu C, et al., Haematologica, 2015; и Casu C, et al., Blood, 2016). Таким образом, мыши $Hbb^{th3/+}$ в настоящее время представляют наилучшую доступную животную модель для тестирования новых методов лечения β -талассемии, что в дальнейшем может служить в качестве показателя соответствующей эффективности при еще более тяжелых формах, таких как TDT.

XI.3. Организация исследования

Целью этого исследования является проверить, вызывает ли одновременное применение хелатора железа DFX, вводимого одного один раз в день (QD) в дозе 30 мг/кг или в комбинации с Fpn127, вводимого QD в дозе 120 мг/кг в течение 3 недель, какие-либо терапевтические взаимодействия у мышинной модели промежуточной β -талассемии ($Hbb^{th3/+}$; B6;129P--b1tm1Unc -b2tm1Unc/J, Jackson Laboratories, Stock Number: 002683). У этих мышей имеется целенаправленная делеция как β -основных, так и β -минорных генов Hb (Yang B, et al., PNAS, 1995).

Мышам $Hbb^{th3/+}$ дают корм с низким содержанием железа (lfd) в течение 18 час и

дают доступ к стандартной диете (sd) в течение 6 час в день, начиная с 3ч после введения DFX. Животных подвергают эвтаназии через 1 час после последней дозы DFX в день 23 исследования (день 17 приема). Кровь и органы (селезенку, печень и почки) собирают для анализа влияния соединений на параметры сыворотки.

Исследование полностью соответствует закону о защите животных.

Тестируемое соединение Fpn127 вводят в форме соли $3 \times \text{HCl}$, растворенной в 0,5% растворе метилцеллюлозы (MC) в количестве 15,24 мг/мл, чтобы обеспечить введение животным 120 мг/кг свободного основания Fpn127 в объеме 10 мл/кг.

DFX предоставляется Ontario Chemicals Inc. (кат. D1063) и растворяется в 30% коллифоре в количестве 3 мг/мл для обеспечения введения животным 30 мг/кг.

Коллифор® EL закупают у Sigma-Aldrich (кат. C5135, партия BCBV8968), и 30% раствор коллифора (мас./об.) получают в дистиллированной воде Milli-Q.

Ежедневное введение одного DFX в дозе 30 мг/кг в течение 3 недель хорошо переносится (без WE) и показывает хорошую эффективность при снижении железа в печени у мышей $\text{Hbb}^{\text{th3/+}}$. Поэтому в этом исследовании комбинации в качестве максимальной дозы для DFX выбирают 30 мг/кг. Режим кормления выбирают таким образом, чтобы предотвратить контакт хелаторов с пищевым железом в желудочно-кишечном тракте (lid в течение 3 час после введения дозы). Ограниченный доступ (6 час) к sd вводят для того, чтобы улучшить динамический диапазон модели, так как в предыдущих исследованиях наблюдалось самопроизвольное разглаживание печени при кормлении lid в течение всего периода исследования. Перорально вводимый Fpn127 имеет относительно короткий период полужизни у грызунов – примерно 2 часа. Однократная пероральная доза 100 мг/кг вызывает у крыс снижение уровня сывороточного железа по меньшей мере на 8ч. В постоянных условиях устанавливают дозу 60 мг/кг дважды в день, которая показывает постоянную эффективность в нескольких исследованиях. В этом исследовании оба соединения необходимо вводить перорально, и поэтому авторы выбирают однократную пероральную дозу 120 мг/кг один раз в день для Fpn127, чтобы свести количество пероральных применений к минимуму. Накопление каждого соединения в испытанных дозах не ожидается из-за их умеренного периода полужизни.

Таблица 2. Обзор групп обработки. В каждой группе используются мыши-самцы (m) и самки (f).

* Носители содержат 30% коллифора в дистиллированной воде Milli-Q и 0,5% метилцеллюлозы в дистиллированной воде Milli-Q

** DFX и Fpn127 вводят с интервалом в 3 часа

*** WT - мыши C57BL/6J, полученные как выращенные однопаметные животные

от размножения th3/+

Генотип	Обработка	Частота	Пол мышей	Число животных
th3/+	носитель/носитель*	QD	6m / 6f	1-12
th3/+	DFX 30 мг/кг	QD	6m / 6f	13-24
th3/+	DFX 30 мг/кг + Fpn127 120 мг/кг**	QD + QD	7m / 6f	25-37
th3/+	Fpn127 120 мг/кг	QD	6m / 6f	38-49
WT***	носитель/носитель*	QD	5m / 5f	50-59

XI.4. Обработка мышей

Таблица 3. Группы обработки и применяемые дозы, концентрации и схемы

* Носители – 30% коллифора в дистиллированной воде Milli-Q и 0,5% метилцеллюлозы в дистиллированной воде Milli-Q

** DFX и Fpn127 вводят с интервалом в 3 часа

*** WT - мыши C57BL/6J, полученные как выращенные однопаметные животные от размножения th3/+

Гено тип	Название группы	Доза [мг/кг BW]	Концентрация [мг/мл]	Объем дозы [мл/кг м.т.]	Частота	Пол	Число животн.
th3/+	th3/+ носитель*	кг	-	10	QD	самцы	1-6
						самки	7-12
th3/+	th3/+ DFX	30	3.0	10	QD	самцы	13-18
						самки	19-24
th3/+	th3/+ DFX + Fpn127 **	30 + 120	3,0 + 15,24	10	QD + QD	самцы	25-31
						самки	32-37
th3/+	th3/+ Fpn127	120	15,24	10	QD	самцы	38-43
						самки	44-49
WT***	WT носитель*	-	-	10	QD	самцы	50-54
						самки	55-59

Через день после перехода на lid берут образец крови путем разреза хвостовой вены для определения исходных уровней Hb. Уровень Hb измеряют с помощью прибора НаемоCue®. Hb также измеряют в дни 8, 15 и 22 утром перед введением лекарства. Животным вводят р.о. QD 30 мг/кг DFX в 30% коллифоре, 120 мг/кг Fpn127 в 0,5% MC или оба в целом 17 доз в течение 23 дней исследования. Вводят 30% коллифор и 0,5% MC в качестве носителей. Дозу DFX вводят в начале темного цикла (активная фаза) в 9:00 с последующим 3-час доступом к lid. Затем мышам вводят дозу Fpn127 (или 0,5% MC) и дают доступ к sd в течение 6 час перед переключением снова на lid. На WE введение приостанавливают, и мыши имеют доступ к lid ad libitum.

Все суспензии/растворы смешивают путем вихревого перемешивания непосредственно перед применением. Пероральное введение осуществляют в дозе 10 мл/кг с использованием иглы с выпуклостью (кат. 191300, Provet, Лиссах, Швейцария), присоединенной к подходящему шприцу. Все дозы вводят как болюсы в пределах секунд.

ХI.5. Последовательные наблюдения

Клинические наблюдения и смертность

Животные и их клетки во время исследования в рабочие дни ежедневно проверяются экспериментатором. Во время экспериментальной фазы животных взвешивают минимум один раз в неделю и оценивают в соответствии с их клиническими симптомами: BW, общее поведение и активность, внешний вид волосяного покрова, глаз и носа. Клинические наблюдения записывают, когда они присутствуют, на отдельных оценочных листах.

Масса тела

BW регистрируют один раз перед началом экспериментальной фазы в день 1. Во время экспериментальной фазы индивидуальную BW регистрируют 1-2 раза в неделю для вычисления объема дозирования и контроля за потерей массы.

Гемоглобин

Hb измеряют в дни 1, 8, 15 и 22. Индивидуальные величины Hb определяют в начальный день эксперимента (день 1) и затем еженедельно во время экспериментальной фазы утром перед первой дневной дозой. Образец крови берут через разрез хвостовой вены, и измеряют Hb с использованием фотометра NemoCue® DM201 Hb.

Эвтаназия и взятие образцов органов

В конце исследования (день 23) животным предварительно дают наркоз, используя изофлуран, и собирают кровь путем ретроорбитального кровотоечения в пробирки BD Microtainer (кат. 365967 и 365975). Отдельных животных впоследствии подвергают эвтаназии путем смещения шейных позвонков.

В последний день исследования (день 23) собирают селезенку, печень и почки и быстро замораживают в жидком азоте для дальнейшего анализа, как описано ниже. Регистрируют влажную массу селезенки, печени и почек.

Тканевое железо

Определяют содержание общего Fe в кусочках селезенки, печени и почек методом ICP-OES в группе аналитических разработок Analytical Development group of Vifor (International) Ltd., St. Gallen.

Гематология и эритропоэз

Проводят полный анализ крови на свежей EDTA-крови на автоматизированном анализаторе клеток крови (ProCyte Dx®, IDEXX Laboratories) собственного производства.

Различные стадии дифференцировки эритроидных клеток в селезенке самок мышей идентифицируют методом проточной цитометрии (цитометр CANTOII, BD Biosciences) с использованием антител PE-конъюгированного крысиного анти-мышинного CD71

(рецептор трансферрина-1, eBioscience, кат. 12-0711), APC-конъюгированного крысиного анти-мышинного Ter119 (маркер эритроидной линии, eBioscience, кат. 17-5921) и APC-Cy7-конъюгированного крысиного анти-мышинного CD44 (молекула адгезии, которая постепенно уменьшается на поверхности развивающихся эритроидных клеток, BioLegend, кат. 103028). Данные анализируют с использованием программного обеспечения FlowJo® (FlowJo, LLC, версия 10.1.).

Параметры сыворотки

В день 23 (конец исследования) через 1 час после введения дозы у мышей, предварительно подвергнутых терминальной анестезии, путем ретроорбитального кровотоечения собирают кровь в пробирки BD Microtainer (кат. 365967 и 365975) для определения сывороточного железа, трансферрина, эритропоэтина и воздействия соединений. Впоследствии животных под наркозом подвергают эвтаназии путем смещения шейных позвонков.

Уровни железа в сыворотке определяют трехкратно с использованием анализа железа MULTIGENT (Abbott Diagnostics, кат. 6K 95). Сывороточный трансферрин (Tf) измеряют двукратно с использованием специфичного для мышей ELISA согласно инструкциям производителя (Abscam, кат. ab157724). Насыщение трансферрином (TSAT) вычисляют по формуле:

$$TSAT [\%] = \frac{SI [\mu g/dL]}{Tf [mg/dL]} \times 71.24$$

$\mu g/dL$ – мкг/дл

ЕРО в сыворотке измеряют с использованием специфичного для мышей DuoSet ELISA согласно инструкциям производителя (R&D Systems, кат. DY959). Концентрации Fpn127 и DFX в плазме измеряют в GVK Biosciences, Hyderabad, IN.

Анализ методом проточной цитометрии внутриклеточных ROS, митохондрий и воздействия PS

В периферической крови, взятой в день 22 путем разреза хвостовой вены, обнаруживают ROS с помощью индикатора диацетата хлорметил-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина (CM-H2DCFDA, Invitrogen), присутствие митохондрий обнаруживают с помощью MitoTracker Deep Red FM (Invitrogen), и воздействие PS обнаруживают с использованием набора Annexin V Apoptosis Detection Kit (Invitrogen) в зрелых RBC, меченных антителами Ter119 и CD71.

Для всех анализов клетки анализируют на цитометре CANTO II (BD Biosciences), и данные анализируют с использованием программного обеспечения FlowJo® (FlowJo, LLC, версия 10.2).

XI.6. Управление данными

Масса тела

Регистрируют индивидуальные величины. Вычисляют средние величины $\pm$ SD BW в граммах для каждой группы в дни регистрации. BW представляют графически.

Тканевое железо

Регистрируют индивидуальные влажные массы органов. Индивидуальные величины общего Fe измеряют в печени, селезенке и почках. Вычисляют индивидуальные величины общего содержания и концентрации Fe. Для каждой группы вычисляют среднее $\pm$ SD общей концентрации и содержания железа в печени, селезенке и почках. Массы органов и общие концентрации Fe представляют графически.

Гемоглобин

Регистрируют индивидуальные величины. Вычисляют среднее $\pm$ SD уровней Hb в г/л для каждой группы в дни измерения. Уровни Hb представляют графически.

Гематология и эритропоэз

Регистрируют индивидуальные величины параметров крови. Вычисляют среднее $\pm$ SD для каждой группы. Выбранные гематологические параметры представляют графически.

Регистрируют индивидуально фракцию стадий дифференцировки эритроидов в селезенке самок мышей. Вычисляют среднее $\pm$ SD каждой фракции в каждой группе и представляют графически.

Параметры сыворотки

Индивидуальные средние величины сывороточного железа вычисляют из двукратных измерений. Уровни Tf и EPO определяют из двукратных измерений. TSAT вычисляют из Tf и уровней сывороточного железа. Среднее $\pm$ SD сывороточного железа, TSAT и EPO вычисляют для каждой группы. Данные по сывороточному железу, TSAT и EPO представляют графически.

Анализ методом проточной цитометрии внутриклеточных ROS, митохондрий и воздействия PS

Регистрируют индивидуально процент эритроидных клеток, окрашенных положительно на ROS, митохондрии и аннексин V. Вычисляют среднее $\pm$ SD для каждой группы и представляют графически.

XI.7. Статистический анализ

Статистический анализ данных BW и Hb выполняют с использованием двустороннего ANOVA с повторными измерениями эффектов с течением времени. Когда наблюдают значительные эффекты, выполняют посттесты с использованием критерия

множественных сравнений Даннетта. Для анализа всех остальных параметров выполняют односторонний ANOVA с критерием множественных сравнений Даннета, как указано в объяснениях обозначений на соответствующих фигурах. Для отдельного анализа самцов и самок выполняют односторонний ANOVA с критерием множественных сравнений Даннета. Значение $p < 0,05$ считается статистически значимым. Статистический анализ осуществляют с помощью программного обеспечения Prism (GraphPad Prism версии 8.1.2, San Diego California USA).

XI.8. Результаты

Клинические наблюдения, оценка и смертность

Fpn 127 и DFX в вводимых QD дозах, как правило, хорошо переносятся, и в течение 23 дней исследования не наблюдалось никаких клинических симптомов. Животное 7 (Hbb^{th3/+} носитель) потеряло $> 20\%$ BW со дня 14 по день 17 и умерщвлено по соображениям благополучия животных. Наиболее вероятно, что это животное получило травму во время перорального чрезназдового кормления и ослабло для поглощения корма. Животное 7 исключается из всех дальнейших анализов.

Масса тела

Средняя BW мышечной массы суммирована в таблице 4.

Таблица 4. Развитие BW в группах обработки на протяжении всего исследования. Данные приводятся как среднее $\pm$ SD для указанного числа животных на группу обработки. Приводятся величины для всех животных и отдельно для самцов и самок. Статистически значимые различия с группой th3/+, носитель, показаны величинами, выделенными жирным шрифтом.

Все животные	th3/+ носитель			th3/+ DFX			th3/+ DFX+ Fpn127			th3/+ Fpn127			WT носитель		
день	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n
1	22,1	3,1	11	21,5	2,7	12	22,5	2,6	13	22,2	3,1	12	22,5	2,2	10
3	24,1	3,2	11	23,2	2,8	12	24,1	2,7	13	23,6	3,5	12	24,0	2,1	10
7	24,2	3,8	11	23,2	2,7	12	23,8	2,8	13	23,1	3,6	12	23,9	2,5	10
10	24,1	3,6	11	22,9	2,7	12	23,8	2,6	13	23,4	3,3	12	23,7	2,3	10
14	24,2	3,7	11	23,0	2,7	12	24,1	2,7	13	23,3	3,3	12	24,0	2,4	10
17	24,4	3,8	11	22,8	2,9	12	23,6	2,8	13	23,2	3,6	12	23,9	2,9	10
22	24,5	4,2	11	23,3	3,1	12	23,9	2,6	13	23,3	3,7	12	24,1	2,7	10
самцы	th3/+ носитель			th3/+ DFX			th3/+ DFX+ Fpn127			th3/+ Fpn127			WT носитель		
день	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n
1	24,5	1,4	6	23,7	1,3	6	24,7	1,1	7	25,1	1,0	6	24,4	0,8	5
3	26,6	1,5	6	25,6	1,5	6	26,4	0,9	7	26,9	0,8	6	25,7	1,1	5
7	27,1	2,0	6	25,4	1,4	6	26,1	1,0	7	26,5	0,6	6	26,0	1,0	5
10	26,9	1,7	6	25,2	1,4	6	26,0	1,0	7	26,5	0,7	6	25,7	1,0	5
14	27,1	1,8	6	25,2	1,4	6	26,4	0,9	7	26,3	0,6	6	26,1	1,2	5
17	27,4	1,8	6	25,2	1,4	6	26,0	0,8	7	26,6	0,5	6	26,4	1,4	5
22	27,8	2,0	6	25,9	1,7	6	26,0	0,9	7	26,7	0,6	6	26,4	1,4	5
самки	th3/+ носитель			th3/+ DFX			th3/+ DFX+ Fpn127			th3/+ Fpn127			WT носитель		
день	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n
1	19,3	1,6	5	19,2	1,3	6	20,0	0,8	6	19,4	1,0	6	20,5	1,1	5
3	21,1	1,6	5	20,9	1,4	6	21,5	0,8	6	20,3	1,1	6	22,3	1,2	5
7	20,7	1,5	5	21,0	1,4	6	21,1	0,6	6	19,8	1,0	6	21,8	1,5	5
10	20,7	1,9	5	20,6	1,3	6	21,2	0,7	6	20,3	0,9	6	21,8	1,2	5
14	20,8	1,4	5	20,7	1,3	6	21,5	0,7	6	20,2	0,9	6	21,9	1,1	5
17	20,9	1,7	5	20,4	1,4	6	20,8	0,7	6	19,7	0,6	6	21,5	1,3	5
22	20,5	1,5	5	20,8	1,7	6	21,3	0,8	6	19,8	0,9	6	21,7	1,2	5

BW в день 1 составляет $24,5 \pm 1,4$ г (самцы th3/+, носитель); $19,3 \pm 1,6$ г (самки th3/+, носитель); $23,7 \pm 1,3$ г (самцы th3/+, DFX); $19,2 \pm 1,3$ г (самки th3/+, DFX); $24,7 \pm 1,1$ г (самцы th3/+, DFX+ Fpn127); $20,0 \pm 0,8$ г (самки th3/+, DFX+ Fpn127); $25,1 \pm 1,0$ г (самцы th3/+, Fpn127); $19,4 \pm 1,0$ г (самки th3/+, Fpn127); $24,4 \pm 0,8$ г (самцы WT, носитель); и $20,5 \pm 1,1$ г (самки WT, носитель). В течение 23 дней масса тела незначительно увеличивается или остается постоянной во всех группах (таблица 4). Отсутствие роста в значительной степени можно объяснить возрастом животных, используемых в данном исследовании. В целом, нет влияния на BW после обработки Fpn127 один раз в день в течение всего исследования (последнюю BW учитывают за день до сакрификации, д.22) у мышей Hbb^{th3/+} по сравнению с мышами Hbb^{th3/+}, обработанными носителем (самцы и самки) или мышами WT. Обработка самцов DFX отдельно или в комбинации с Fpn127 приводит к небольшой, но значительно меньшей BW к концу исследования по сравнению с мышами Hbb^{th3/+}, обработанными носителем.

Тканевое железо

Оценивают массу печени в конце исследования. Нет различия в массе печени у мышей th3/+ (1176 ± 196 мг) по сравнению с мышами WT (1053 ± 169 мг). Обработка мышей Hbbth3/+ DFX, Fpn127 или тем и другим QD не влияет на массу печени по сравнению с мышами Hbbth3/+, обработанными носителем (таблица 5; фиг. 3).

Общая концентрация железа в печени (мкг/г) сильно повышена у мышей th3/+ ($348,2 \pm 75,4$ мкг/г) по сравнению с мышами WT ($88,2 \pm 25,7$ мкг/г) (таблица 5, фиг. 3). Обработка DFX отдельно или в комбинации с Fpn127 значительно снижает общую концентрацию железа в печени по сравнению с мышами th3/+, обработанными носителем (фиг. 3, посередине): $348,2 \pm 75,4$ мкг/г (th3/+, носитель); $196,3 \pm 62,5$ мкг/г (th3/+, DFX); и $178,91 \pm 54,4$ мкг/г (th3/+, DFX+ Fpn127). Эффективности одного DFX и в комбинации с Fpn127 сопоставимы. Как показано ранее, один Fpn127 не оказывает влияния на концентрацию железа в печени: $332,2 \pm 75,2$ мкг/г (th3/+, Fpn127).

Оценивают массу селезенки и нормализуют к BW тела в конце исследования (д.23). Относительная масса селезенки (выраженная в процентах от массы тела) значительно выше у животных Hbbth3/+ ($1,94 \pm 0,36\%$) по сравнению с WT животными ($0,28 \pm 0,06\%$) (фиг. 4, таблица 6). Обработка мышей Hbbth3/+ одним Fpn 127 или в комбинации с DFX значительно уменьшает относительную массу селезенки у животных th3/+, в то время как один DFX действие не показывает (фиг. 4, таблица 6): $1,94 \pm 0,36\%$ (th3/+, носитель); $1,98 \pm 0,26\%$ (th3/+, DFX); $0,92 \pm 0,13\%$ (th3/+, DFX+ Fpn127) и $0,99 \pm 0,18\%$ (th3/+, Fpn127).

Общая концентрация железа в селезенке (мкг/г) сильно повышена у мышей Hbbth3/+ ($1664,0 \pm 185,6$ мкг/г) по сравнению с мышами WT ($596,9 \pm 164,4$ мкг/г) (таблица

6, фиг. 4). Никакого эффекта от обработки одним DFX на общую концентрацию железа в селезенке не наблюдают, в то время как обработка одним Fpn 127 или в комбинации с DFX значительно увеличивает концентрацию железа в селезенке у мышей th3/+ по сравнению с мышами th3/+, обработанными носителем (таблица 6, фиг. 4): $1664,0 \pm 185,6$ мкг/г (th3/+, носитель); $1553,0 \pm 144,7$ мкг/г (th3/+, DFX); $3051,0 \pm 258,4$ мкг/г (th3/+, DFX+ Fpn127); $2738,0 \pm 300,8$ мкг/г (th3/+, Fpn127) и $596,9 \pm 164,4$ мкг/г (WT, носитель). Никаких гендерных различий в концентрации железа в селезенке не наблюдают (фиг. 4, внизу). Повышенная концентрация железа в селезенке у мышей th3/+, обработанных Fpn 127, соотносится со сниженной массой селезенки и удержанием железа вследствие ингибирования ферропортина в макрофагах селезенки.

В конце исследования оценивают массу почек. Масса почек у мышей Hbbth3/+ (297 ± 55 г) не отличается при сравнении с мышами WT (286 ± 34 г) (фиг. 5). Обработка мышей Hbbth3/+ DFX, Fpn127 или обоими соединениями не влияет на массу почек по сравнению с мышами Hbbth3/+, обработанными носителем (таблица 7, фиг. 5 вверху).

Общая концентрация железа в почках (мкг/г) значительно выше у мышей Hbbth3/+ ($155,5 \pm 42,9$ мкг/г) по сравнению с мышами WT ($75,3 \pm 6,5$ мкг/г) (таблица 7). Все виды обработки значительно снижают общую концентрацию железа в почках по сравнению с мышами Hbbth3/+, обработанными носителем (фиг. 5 посередине): $155,5 \pm 42,9$ мкг/г (th3/+, носитель); $125,1 \pm 22,2$ мкг/г (th3/+, DFX); $96,6 \pm 12,8$ мкг/г (th3/+, DFX+ Fpn127); $126,7 \pm 23,6$ мкг/г (th3/+, Fpn127) и $75,3 \pm 6,5$ мкг/г (WT, носитель). Удивительно, но комбинация DFX с Fpn127 приводит к большему снижению концентрации железа в печени по сравнению с одним DFX или Fpn127 ($p=0,02$ и $p=0,01$ соответственно). Этот аддитивный эффект может иметь место из-за удаления железа с помощью DFX и предотвращения Fpn127 дополнительной загрузки железа в почках. Не наблюдается гендерных различий в концентрации железа в почках (фиг. 5, внизу).

Таблица 5. Масса печени и концентрация железа в группах обработки в конце исследования. Данные приводятся как среднее $\pm$ SD для указанного числа животных на группу обработки. Статистически значимые различия с группой th3/+, носитель, показаны цифрами, выделенными жирным шрифтом.

Все животные	th3/+, носитель			th3/+, DFX			th3/+, DFX+ Fpn127			th3/+, Fpn127			WT, носитель		
	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n
Масса печени [мг]	1176	196	11	1177	165	12	1221	153	13	1131	230	12	1053	169	10
Конц. Fe [мкг/г]	348,2	75,4	11	196,3	62,5	12	178,9	54,4	13	332,2	75,2	12	88,2	25,7	10
самцы	th3/+, носитель			th3/+, DFX			th3/+, DFX+ Fpn127			th3/+, Fpn127			WT, носитель		
	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n
Масса печени [мг]	1326	78	6	1302	111	6	1350	48	7	1337	99	6	1171	109	5
Конц. Fe [мкг/г]	304,7	56,1	6	151,5	46,1	6	137,6	28,4	7	292,5	41,9	6	67,4	9,4	5
самки	th3/+, носитель			th3/+, DFX			th3/+, DFX+ Fpn127			th3/+, Fpn127			WT, носитель		
	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n
Масса печени [mg]	996	119	5	1052	101	6	1071	59	6	925	64	6	935	132	5
Fe conc. [мкг/г]	400,4	63,6	5	241,2	40,4	6	227,2	30,7	6	371,8	83,1	6	109,0	17,8	5

Таблица 6. Масса селезенки и концентрация железа в группах обработки в конце исследования. Данные приводятся как среднее $\pm$ SD для указанного числа животных на группу обработки. Статистически значимое различие с группой th3/+, носитель, указано цифрами, выделенными жирным шрифтом.

Все животные	th3/+, носитель			th3/+, DFX			th3/+, DFX+ Fpn127			th3/+, Fpn127			WT, носитель		
	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n
Относительная масса селезенки [%]	1,94	0,36	11	1,98	0,26	12	0,92	0,13	13	0,99	0,18	12	0,28	0,06	10
Конц, Fe [мкг/г]	1664,0	185,6	11	1553,0	144,7	11	3051,0	258,4	12	2738,0	300,8	11	596,9	164,4	10
самцы	th3/+, носитель			th3/+, DFX			th3/+, DFX+ Fpn127			th3/+, Fpn127			WT, носитель		
	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n
Относительная масса селезенки [%]	1,68	0,18	6	1,79	0,21	6	0,82	0,10	7	0,86	0,08	6	0,24	0,03	5
Конц, Fe[мкг/г]	1757,0	144,3	6	1602,0	136,3	5	2927,0	106,9	6	2760,0	344,7	6	456,8	86,5	5
самки	th3/+, носитель			th3/+, DFX			th3/+, DFX+ Fpn127			th3/+, Fpn127			WT, носитель		
	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n
Относительная масса селезенки [%]	2,25	0,25	5	2,17	0,12	6	1,03	0,05	6	1,12	0,16	6	0,33	0,03	5
Конц, Fe [мкг/г]	1554,0	178,7	5	1511,0	150,1	6	3175,0	314,2	6	2713,0	276,1	5	737,0	65,4	5

Таблица 7. Масса почек и концентрация железа в группах обработки в конце исследования. Данные приводятся как среднее $\pm$ SD для указанного числа животных на группу обработки. Статистически значимое различие с группой th3/+, носитель, показано цифрами, выделенными жирным шрифтом.

Все животные	th3/+, носитель			th3/+, DFX			th3/+, DFX+ Fpn127			th3/+, Fpn127			WT, носитель		
	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n
Масса почек [мг]	297	55	11	285	40	12	299	36	13	281	43	12	286	34	10
Конц, Fe [мкг/г]	155,5	42,9	11	125,1	22,2	12	96,6	12,8	13	126,7	23,6	12	75,3	6,5	10
самцы	th3/+, носитель			th3/+, DFX			th3/+, DFX+ Fpn127			th3/+, Fpn127			WT, носитель		
	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n
Масса почек [мг]	338	28	6	313	31	6	325	25	7	317	22	6	311	16	5
Конц, Fe [мкг/г]	149,5	54,2	6	123,6	26,7	6	88,4	11,2	7	114,5	17,2	6	73,5	4,7	5
самки	th3/+, носитель			th3/+, DFX			th3/+, DFX+ Fpn127			th3/+, Fpn127			WT, носитель		
	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n
Масса почек [мг]	247	30	5	256	23	6	268	15	6	245	22	6	260	25	5
Конц, Fe [мкг/г]	162,7	28,3	5	126,6	19,1	6	106,0	6,4	6	138,9	23,8	6	77,1	8,1	5

Гемоглобин

Концентрации Hb измеряют в цельной крови перед введением лекарства в день 1 и затем еженедельно (день 8, 15, 22). Образцы крови берут перед первой дозой на день. Животные Hbbth3/+ показывают значительно сниженные уровни Hb по сравнению с животными WT до введения дозы (день 1) (фиг. 6, таблица 8): 83 ± 3 г/л (самцы th3/+, носитель); 90 ± 3 г/л (самки th3/+, носитель); 82 ± 3 г/л (самцы th3/+, DFX); 86 ± 2 г/л (самки th3/+, DFX); 86 ± 6 г/л (самцы th3/+, DFX+ Fpn127); 87 ± 3 г/л (самки th3/+, DFX+ Fpn127); 85 ± 6 г/л (самцы th3/+, Fpn127); 85 ± 4 г/л (самки th3/+, Fpn127); 153 ± 3 г/л (самцы WT, носитель) и 154 ± 5 г/л (самки WT, носитель). На протяжении исследования уровни Hb увеличиваются со временем у животных Hbbth3/+, обработанных одним Fpn127 или в комбинации с DFX (фиг. 6). Один DFX приводит к временному повышению уровней Hb только в день 8. Существенных гендерных различий не наблюдают.

Гематология и эритропоэз

Гематологические параметры определяют в образцах цельной крови, взятых в последний день исследования (день 23). Мыши Hbbth3/+ значительно отличаются от мышей WT по всем проверяемым гематологическим параметрам (таблица 9). Один DFX не может улучшить показатели RBC, такие как количество RBC, гематокрит, RDW и количество ретикулоцитов. Все эти параметры значительно улучшаются у мышей Hbbth3/+, обработанных Fpn127 одним или в комбинации с DFX, что отражает улучшенную эритропоэтическую эффективность (таблица 9, фиг. 7).

Количество лейкоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов у мышей Hbb^{th3/+}, обработанных одним Fpn 127 или в комбинации с DFX, снижается до уровней, схожих с WT. Однако один DFX существенно не изменяет общее количество лейкоцитов и лимфоцитов у мышей Hbb^{th3/+} (таблица 9, фиг. 8). Представляет интерес, что обработка мышей Hbb^{th3/+} одним DFX приводит к значительному увеличению количества нейтрофилов, что указывает на возможную воспалительную реакцию. На количество моноцитов никакая обработка не влияет (данные не приводятся).

При β -талассемии ограниченная дифференцировка и повышенный апоптоз предшественников эритроидов ведет к экстрамедуллярному эритропоэзу и разрастанию эритроидов в костном мозге и селезенке. Ранее показано, что Fpn127 уменьшает долю незрелых эритроидных клеток, причем в то же время увеличивается число зрелых RBC в ВМ и селезенке мышей Hbbth3/+. Соответственно, мыши Hbbth3/+ имеют в селезенке более высокий процент эритроидных предшественников и более низкий процент зрелых RBC (фиг. 9, таблица 10). Один DFX не может вернуть этот фенотип. Напротив, у мышей Hbbth3/+, обработанных одним Fpn 127 или в комбинации с DFX, процент незрелых

эритроидных клеток заметно снижается, в то время как процент RBC увеличивается (фиг. 9, таблица 10), что указывает на снижение неэффективного эритропоэза и усиление дифференцировки.

Таким образом, одно хелатирование железа не улучшает гематологические параметры у мышей Hbbth3 /+, в то время как Fpn 127 в присутствии или в отсутствие DFX улучшает эритропоэз.

Таблица 8. Концентрация Hb [г/л] в группах обработки в течение всего исследования. Данные приводятся как среднее $\pm$ SD для указанного числа животных на группу обработки. Приводятся средние величины для всех животных и отдельно для самцов и самок. Статистически значимое различие с группой th3/+, носитель, показано цифрами, выделенными жирным шрифтом.

Все животные	th3/+, носитель			th3/+, DFX			th3/+, DFX+ Fpn127			th3/+, Fpn127			WT, носитель		
день	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n
1	86	5	11	84	3	12	86	5	13	85	5	12	154	4	10
8	87	3	11	98	5	12	101	5	13	92	4	12	161	5	10
15	80	5	11	81	4	12	95	5	13	96	5	12	157	5	10
22	85	7	11	86	5	12	103	5	13	98	6	12	159	5	10
самцы	th3/+, носитель			th3/+, DFX			th3/+, DFX+ Fpn127			th3/+, Fpn127			WT, носитель		
день	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n
1	83	3	6	82	3	6	86	6	7	85	6	6	153	3	5
8	85	2	6	96	5	6	103	2	7	90	3	6	158	5	5
15	77	5	6	80	4	6	93	4	7	93	4	6	157	5	5
22	81	6	6	88	6	6	103	6	7	95	6	6	159	5	5
самки	th3/+, носитель			th3/+, DFX			th3/+, DFX+ Fpn127			th3/+, Fpn127			WT, носитель		
день	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n
1	90	3	5	86	2	6	87	3	6	85	4	6	154	5	5
8	89	3	5	99	5	6	99	6	6	93	5	6	164	2	5
15	83	4	5	82	3	6	97	4	6	99	4	6	158	5	5
22	90	5	5	85	3	6	104	3	6	101	5	6	158	6	5

Таблица 9. Выбранные параметры крови всех мышей из каждой группы обработки в конце исследования. Данные приводятся как среднее $\pm$ SD для указанного числа животных на группу обработки. Самцы и самки отдельно не показаны, так как не наблюдались гендерные различия параметров крови. Статистически значимое различие с группой th3/+, носитель, показано цифрами, выделенными жирным шрифтом.

Все животные	th3/+, носитель			th3/+, DFX			th3/+, DFX+ Fpn127			th3/+, Fpn127			WT, носитель		
	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n
HCT [%]	26,6	1,4	11	27,4	1,8	12	32,1	1,7	13	31,2	3,0	11	49,9	1,6	10
RBC [10E6/мкл]	7,9	0,7	11	7,7	0,4	12	9,9	0,2	13	9,9	0,6	11	10,6	0,4	10
RDW [%]	46,0	1,7	11	47,0	0,9	12	39,3	1,0	13	39,1	1,0	11	23,3	0,9	10
MCH [пг]	10,3	0,2	11	10,4	0,1	12	10,0	0,1	13	9,9	0,3	11	14,0	0,1	10
MCHC [г/дл]	26,1	0,9	11	25,4	1,2	12	26,8	1,0	13	27,4	1,02	11	28,1	0,5	10
MCV [фл]	39,4	1,5	11	41,1	2,2	12	37,1	1,5	13	36,4	2,1	11	50,0	0,8	10
RET [10E3/мкл]	1887	299	11	1760	587	12	1449	355	13	1332	362	11	344	61	10
Ret-He [пг]	12,5	0,2	11	12,8	0,4	12	11,9	0,1	13	11,8	0,5	11	16,3	0,3	10
Лейкоциты [10E3/мкл]	9,4	1,5	11	8,9	1,8	12	5,5	1,2	13	5,7	1,8	11	4,3	1,6	10
Нейтрофилы [10E3/мкл]	0,8	0,1	11	1,2	0,4	12	0,6	0,4	13	0,3	0,1	10	0,5	0,2	10
Лимфоциты [10E3/мкл]	8,4	1,4	11	7,4	1,5	12	4,7	1,0	13	5,0	1,4	11	3,7	1,4	10

Таблица 10. Популяции эритроидных клеток в селезенке мышей Hbb^{th3/+} и WT, измеренные проточной цитометрией в конце исследования. Данные приводятся как среднее ± SD для указанного числа животных на группу обработки. Статистически значимое различие с группой th3/+, носитель, показано цифрами, выделенными жирным шрифтом.

	th3/+, носитель			th3/+, DFX			th3/+, DFX+ Fpn127			th3/+, Fpn127			WT, носитель		
Частота от родителей [%]	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n
Прозэритробласты	3,40	0,58	5	3,29	0,67	6	2,19	0,47	5	1,74	0,62	6	1,39	0,41	5
Базофильные эритробласты	7,82	0,77	5	8,21	1,04	6	6,09	1,12	6	4,94	2,13	6	1,80	0,59	5
Полихроматические эритробласты	23,76	2,98	5	23,90	2,21	6	7,05	0,86	6	9,44	2,49	6	1,15	0,43	5
Ортохроматические эритробласты	24,32	1,05	5	23,48	2,88	6	13,42	2,27	6	14,65	2,40	6	4,74	0,89	5
Зрелые эритроциты	30,22	3,45	5	32,35	1,77	6	52,00	3,69	6	53,52	8,09	6	66,78	6,86	5

Параметры сыворотки

Исследование прекращают через 1 час после введения DFX (в последний день Fpn 127 не вводят) в день 23, и собирают сыворотку и плазму для анализа на сывороточное железо, Tf, рассчитанное TSAT, EPO и нахождение соединений в плазме.

По сравнению с животными th3/+, обработанными носителем, и животными WT, у животных Hbbth3/+, которым вводили один Fpn127 (последняя доза за 20 час до этого) или в комбинации с DFX, сывороточное железо значительно снижается, в то время как у мышей, обработанных одним DFX, изменений не наблюдается (фиг. 10 слева, таблица 11): $28,7 \pm 5,8$ мкМ (th3/+, носитель); $30,8 \pm 5,9$ мкМ (th3/+, DFX); $23,1 \pm 3,5$ мкМ (th3/+, DFX + Fpn127); $19,9 \pm 3,3$ мкМ (th3/+, Fpn127) и $29,9 \pm 2,8$ мкМ (WT, носитель). Снижение сывороточного железа у мышей Hbbth3/+ приблизит. через 20ч после последней дозы Fpn127 является неожиданным, так как в предыдущем исследовании сывороточное железо у мышей C57BL/6 WT, которым вводили 120 мг/кг Fpn127, восстанавливается до исходных уровней в течение 20 часов. Одна из возможностей состоит в том, что воздействие Fpn127 через 20 часов в плазме у мышей Hbbth3/+ отличается по сравнению с мышами WT. Для решения этого вопроса необходимы исследования РКРД с использованием мышей Hbbth3/+ и WT. Никаких гендерных различий не наблюдается.

TSAT у животных Hbbth3/+, обработанных носителем, значительно ниже, чем у животных WT. Уровни TSAT в основном отражают уровни сывороточного железа и значительно снижаются у мышей Hbbth3/+, обработанных одним Fpn127, и показывают тенденцию в комбинации с DFX (фиг. 10 посередине, таблица 11). В соответствии с отсутствием изменений в сывороточном железе один DFX не влияет на TSAT.

Величины EPO в сыворотке сильно варьируются во всех группах Hbb^{th3/+} по сравнению с величинами EPO в группе WT. Как показано ранее, уровни EPO значительно повышены у животных Hbbth3/+, обработанных носителем (7144 ± 3216 пг/мл), по сравнению с животными WT (1470 ± 566 пг/мл). Обработка одним Fpn 127 или в комбинации с DFX снижает уровни EPO у животных Hbb^{th3/+}, тогда как один DFX не достигает статистической значимости (таблица 11; фиг. 10, внизу): 7144 ± 3216 пг/мл (th3/+, носитель); 5277 ± 1710 пг/мл (th3/+, DFX); 4460 ± 1330 пг/мл (th3/+, DFX+ Fpn127), 3938 ± 1167 пг/мл (th3/+, Fpn127) и 1470 ± 566 пг/мл (WT, носитель).

Через 1 час после введения DFX в день 23 собирают плазму для определения концентрации соединения методом ЖХ-МС/МС. Воздействие DFX в плазме схоже с воздействием у животных, получавших один DFX или в комбинации с Fpn127 (фиг. 11, таблица 12). Аналогичным образом, воздействие в плазме Fpn127 в присутствии или в отсутствие DFX сравнимо. Как ожидалось, уровни Fpn127 в плазме низкие, так как

образец плазмы взят приблизительно через 20ч после последней дозы Fpn127.

Таблица 11. Уровни сывороточного железа, TSAT и EPO в группах обработки в конце исследования. Данные приводятся как среднее $\pm$ SD для указанного числа животных на группу обработки. Статистически значимое различие с группой th3/+, носитель, показано цифрами, выделенными жирным шрифтом.

Все животные	th3/+, носитель			th3/+, DFX			th3/+, DFX+ Fpn127			th3/+, Fpn127			WT, носитель		
	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n
Сывороточное железо [мкМ]	28,7	5,8	11	30,8	5,9	12	23,1	3,5	13	19,9	3,3	12	29,9	2,8	10
TSAT [%]	24,9	6,6	11	27,5	4,3	12	22,9	3,2	13	17,7	2,4	12	32.1	3,4	10
EPO [пг/мл]	7144	3216	11	5277	1710	12	4460	1330	13	3938	1167	12	1470	566	10

Таблица 12. Воздействие в плазме DFX и Fpn127 в конце исследования. Данные приводятся как среднее и SD для указанного числа (n) животных на группу обработки. n.d. – величины не определялись

Все животные	th3/+, носитель			th3/+, DFX			th3/+, DFX+ Fpn127			th3/+, Fpn127			WT, носитель		
	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n
DFX [нг/мл]	0	0	5	15413	4008	12	14166	2923	13	n.d.	n.d.	n.d.	0	0	5
Fpn127 [нг/мл]	0	0	6	n.d.	n.d.	n.d.	88	41	13	68	34	12	0	0	5

Анализ методом проточной цитометрии внутриклеточных ROS, воздействия PS и митохондрий

При β -талассемии несбалансированный синтез α - и β -глобиновых цепей Hb ведет к образованию гемихромов, нерастворимых агрегатов α -глобина, содержащих свободный гем и железо, вызывающих образование реактивных форм кислорода (ROS) и апоптоз RBC. Анализ ROS в крови методом проточной цитометрии с использованием флуоресцентного индикатора CM-H2DCFDA показывает, что один Fpn127 или в комбинации с DFX значительно снижает долю ROS-продуцирующих RBC по сравнению с мышами Hbbth3/+, обработанными носителем или одним DFX (таблица 13, фиг. 12 вверху).

Плазматическая мембрана RBC пациентов и мышей с талассемией имеет поврежденные фосфолипиды и белковую организацию, приводящие к воздействию PS на внешнюю мембрану, что ведет к апоптозу. Обработка одним Fpn 127 существенно уменьшает долю PS-положительных RBC, как показывает окрашивание аннексином V (таблица 13, фиг. 12, посередине). Один DFX не оказывает действия на воздействие PS, в то время как DFX в комбинации с Fpn127 показывает незначительную тенденцию к снижению воздействия PS.

RBC вырабатывают энергию путем гликолиза, и при созревании ретикулоциты здоровых индивидуумов очищают митохондрии путем митофагии (Zhang J., Autophagy, 2009). Однако при талассемии митофагия является неполной, и зрелые RBC содержат митохондрии, генерирующие ROS в результате окислительного фосфорилирования. Мыши Hbbth3/+, обработанные одним Fpn127 или в комбинации с DFX, имеют меньше митохондрий, содержащих RBC, по сравнению с мышами Hbbth3/+, обработанными носителем и обработанными DFX (таблица 13, фиг. 12, внизу), что предполагает, что только Fpn127 приводит к улучшению созревания RBC.

В итоге DFX не улучшает функцию RBC в отношении окислительного стресса, апоптоза и созревания, в то время как обработка Fpn 127, одним или в комбинации с DFX, приводит к улучшению качества RBC.

Таблица 13. Процент маркерположительных зрелых RBC в цельной крови в конце исследования (предпоследний д.22). Данные приводятся как среднее $\pm$ SD для указанного числа животных на группу обработки. Статистически значимое различие с группой th3/+, носитель, показано цифрами, выделенными жирным шрифтом.

Все животные	th3/+, носитель			th3/+, DFX			th3/+, DFX+ Fpn127			th3/+, Fpn127			WT, носитель		
	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n	среднее	SD	n
% ROS-положит. RBC	40,28	5,16	11	41,56	3,83	12	27,80	3,80	13	32,82	4,01	12	1,96	1,20	10
% аннекс. в V-положит. RBC	0,44	0,06	11	0,47	0,14	12	0,36	0,05	13	0,29	0,07	12	0,39	0,13	10
% Mito Tracker-положит. RBC	0,50	0,14	11	0,56	0,17	12	0,19	0,13	13	0,19	0,06	12	0,14	0,07	10

XI.9. Выводы

Введение доз DFX (30 мг/кг), Fpn127 (120 мг/кг) и комбинации обоих соединений в течение 17 дней не оказывает существенного влияния на BW самцов и самок мышей Hbbth3/+ и хорошо переносится.

Мыши с талассемией поглощают избыточное количество железа как следствие неадекватно низких уровней гепсидина, связанных с высоким содержанием железа в печени, селезенке и почках и повышенной экспрессией Fpn в двенадцатиперстной кишке (Gardenghi S, et al., Blood, 2007). Общее содержание железа в органах мышей Hbb^{th3/+}, обработанных носителем, DFX или Fpn127 или комбинацией лекарств, анализируют методом оптической эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-OES).

Общие концентрации железа в печени мышей Hbb^{th3/+}, которым вводили один DFX или в комбинации с Fpn127, значительно снижены по сравнению с концентрациями у мышей, обработанных носителем. Как показано ранее, один Fpn127 не способен снижать концентрацию железа в печени.

Общая концентрация железа в почках мышей Hbb^{th3/+} значительно снижена у всех мышей, обработанных соединением, по сравнению с мышами, обработанными носителем. Неожиданно оказалось, что комбинация Fpn127 и DFX является более эффективной при снижении концентраций железа в почках, чем любая обработка в отдельности. Такие данные ясно показывают, что Fpn127 не влияет на лечение хелатированием, и что комбинированная терапия Fpn127 и DFX демонстрирует удивительный синергический эффект путем снижения концентрации железа в почках до более низкого уровня, чем

любое лечение в отдельности.

Несмотря на то, что введение одного DFX успешно снижает концентрацию железа в органах, оно не улучшает параметры эритропоэза, такие как масса селезенки (фиг. 4), Hb (фиг. 6), количество RBC и ретикулоцитов, гематокрит (фиг. 7) и сывороточный EPO (фиг. 10). Все эти параметры существенно улучшаются у мышей *Hbb^{th3/+}*, обработанных одним Fpn127 или в комбинации с DFX, демонстрируя улучшенную эффективность эритропоэза. В соответствии с этими результатами, увеличение предшественников эритроидов значительно уменьшается в селезенке во всех группах, обрабатываемых Fpn127 (фиг. 9), в то время как один DFX не оказывает действия.

В частности, один Fpn127 или в комбинации с DFX значительно повышает уровни Hb у мышей *Hbb^{th3/+}* по сравнению с мышами, обработанными носителем. Изменение уровней Hb у мышей, получавших дозу Fpn127 или комбинацию, достигают 13 г/л и 18 г/л к концу исследования, соответственно, по сравнению с мышами, обработанными носителем. Обработка мышей *Hbb^{th3/+}* одним Fpn127 или в комбинации с DFX увеличивает количество RBC, гематокрит (HCT) и уменьшает количество ретикулоцитов и ширину распределения RBC (RDW), отражая улучшенный эритропоэз. Обработка одним DFX не улучшает эритропоэз. Кроме того, один Fpn127 или в комбинации с DFX корректирует количество лейкоцитов в крови мышей *Hbb^{th3/+}* до нормального уровня у мышей WT, в то время как один DFX не оказывает действия.

Экстрамедуллярный эритропоэз у мышей *Hbb^{th3/+}* вызывает чрезмерную пролиферацию предшественников эритроидов в селезенке, ведущую к спленомегалии. Обработка мышей *Hbb^{th3/+}* одним Fpn127 или в комбинации с DFX приводит к значительному снижению массы селезенки, в то время как один DFX не оказывает действия. Также исследовали эритропоэз путем анализа процентного содержания дифференцирующихся предшественников эритроидов в селезенке, идентифицированных маркерами Ter119/CD44 и анализированных методом проточной цитометрии. Существенно сниженные Fpn127 в присутствии и в отсутствие DFX процентные содержания ранних предшественников эритроидов проэритробластов, базофильных, полихроматических и ортохроматических эритробластов в селезенке мышей *Hbb^{th3/+}* и увеличенные проценты зрелых RBC по сравнению с мышами *Hbb^{th3/+}*, обработанными носителем, у мышей, обработанных одним Fpn127 или в комбинации с DFX, значительно ниже по сравнению с группой носителем. Обработка одним DFX также показывает тенденцию к снижению уровней EPO в сыворотке, но не достигает статистической значимости.

Кроме того, только в присутствии Fpn127 повышенное количество лейкоцитов в

периферической крови мышей Hbbth3/+ значительно снижается, что указывает на способность Fpn127 уменьшать воспаление при β -талассемии.

Несбалансированный синтез α - и β -глобиновых цепей Hb ведет к образованию нерастворимых агрегатов α -глобина, содержащих свободный гем и железо, вызывая образование ROS и апоптоз эритроидных предшественников поздней стадии. Как последовательно показано в предыдущих исследованиях, Fpn127 значительно снижает процент ROS-положительных RBC, уменьшает долю зрелых RBC, содержащих митохондрии, и снижает апоптопический сигнал (фосфатидилсерин, PS) на RBC.

Обработка одним Fpn 127 или в комбинации также улучшает качество зрелых RBC, а именно, уменьшает продукцию внутриклеточных ROS, уменьшает воздействие PS и уменьшает удержание митохондрий (фиг. 12). DFX не улучшает качество RBC в каком-либо аспекте.

Комбинированная обработка с DFX не влияет на благоприятное действие Fpn 127 на фенотип RBC, в то время как один DFX не оказывает действия.

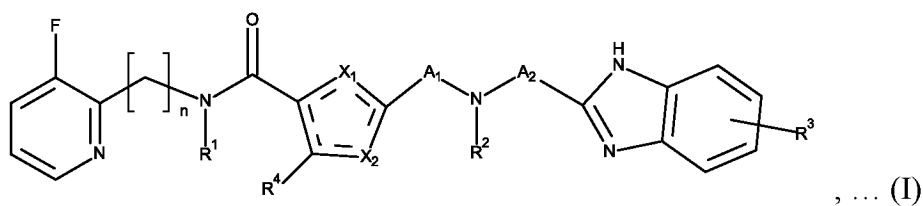
В совокупности это исследование показывает, что вызванную DFX экскрецию железа из печени можно выполнить, несмотря на ингибирование Fpn Fpn127. Кроме того, Fpn127, вводимый отдельно или вместе с DFX, показывает подобную эффективность в улучшении при анемии, эритропоэзе и уменьшения размера селезенки у мышей th3/+.

При этом результаты ясно показывают, что (i) Fpn127 не влияет на хелатирование железа и (ii) терапия хелатированием железа не влияет на положительное действие Fpn127 на эритропоэз. Таким образом, совместное введение перорального ингибитора ферропортина Fpn127 и хелатора железа DFX возможно и может дать преимущество реверсии установленной перегрузки железом и улучшения эритропоэза при β -талассемии. Комбинация хелатирования железа с Fpn127 дает преимущество реверсии установленной перегрузки железом с улучшением эритропоэза на Hb^{bth3/+} модели β -талассемии.

Такие данные подтверждают эффективность комбинированной терапии ингибиторами ферропортина по настоящему изобретению с обычной терапией хелаторами железа, например деферазироксом, при лечении β -талассемии, например, в частности, при ее тяжелых формах, таких как TDT.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I) для применения при лечении трансфузионно-зависимой β -талассемии



где

X^1 представляет собой N или O; и

X^2 представляет собой N, S или O;

при условии, что X^1 и X^2 являются различными;

R^1 выбран из группы, состоящей из

- водорода и
- необязательно замещенного алкила;

n равен целому числу от 1 до 3;

A^1 и A^2 выбраны независимо из группы алкандиила;

R^2 представляет собой

- водород или
- необязательно замещенный алкил;

или

A^1 и R^2 вместе с атомом азота, с которым они связаны, образуют необязательно замещенный 4-6-членный цикл;

R^3 обозначает 1, 2 или 3 необязательных заместителя, которые могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из

- галогена,
- циано,
- необязательно замещенного алкила,
- необязательно замещенного алкокси и
- карбоксильной группы;

R^4 выбран из группы, состоящей из

- водорода,
- галогена,
- C_1 - C_3 -алкила и
- замещенного галогеном алкила;

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, гидрат и полиморф.

2. Соединение формулы (I) или его соль, сольват, гидрат или полиморф для применения по п. 1, причем лечение включает введение одного или нескольких из соединений формулы (I), их солей, сольватов, гидратов или полиморфов пациентам, страдающим от β -талассемии и/или β -талассемии с гемоглобином E и требующим регулярного переливания крови.

3. Соединение формулы (I) или его соль, сольват, гидрат или полиморф для применения по любому из предшествующих пунктов, где пациенты страдают от большой β -талассемии и/или тяжелой β -талассемии с гемоглобином E.

4. Соединение формулы (I) или его соль, сольват, гидрат или полиморф для применения по любому из предшествующих пунктов, где пациенты, страдающие от β -талассемии и требующие регулярного переливания крови, характеризуются

- a) генотипом из группы, состоящей из β^0/β^0 , β^+/ β^+ , β^0/β^+ и β^0/HbE или
- b) генотипом, включающим совместное наследование двух тяжелых мутаций бета-цепи гемоглобина,

и необязательно наличием наследственной персистенции фетального гемоглобина.

5. Соединение формулы (I) или его соль, сольват, гидрат или полиморф для применения по любому из предшествующих пунктов, где пациенты, страдающие от β -талассемии и требующие регулярного переливания крови, характеризуются

- a) наличием детектируемых уровней NTBI и/или
- b) наличием уровней Hb ниже 7 г/дл и/или
- c) наличием MCV от 50 до 70 фл и/или
- d) наличием MCH от 12 до 20 пг.

6. Соединение формулы (I) или его соль, сольват, гидрат или полиморф для применения по любому из предшествующих пунктов, причем регулярные переливания крови включают

- a) повторные трансфузии крови с равными значениями единиц красных клеток крови (RBC) с изменяющимися последовательными временными интервалами или
- b) повторные трансфузии крови с равными значениями единиц RBC с равными последовательными временными интервалами или
- c) повторные трансфузии крови с изменяющимися значениями единиц RBC с равными последовательными временными интервалами или
- d) повторные трансфузии крови изменяющимися значениями единиц RBC с изменяющимися последовательными временными интервалами.

7. Соединение формулы (I) или его соль, сольват, гидрат или полиморф для применения по любому из предшествующих пунктов, причем регулярные переливания

крови означают переливания крови более 5 раз в течение 24 недель.

8. Соединение формулы (I) или его соль, сольват, гидрат или полиморф для применения по любому из предшествующих пунктов, причем лечение включает пероральное введение одного или нескольких из соединений формулы (I), их солей, сольватов, гидратов или полиморфов пациенту, нуждающемуся в этом.

9. Соединение формулы (I) или его соль, сольват, гидрат или полиморф для применения по любому из предшествующих пунктов, причем лечение включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, дозы в 5 мг, 15 мг, 60 мг, 120 мг или 240 мг, предпочтительно дозы в 120 мг для пациентов с массой тела >50 кг и 60 мг для пациентов с массой тела <50 кг один раз или дважды в день.

10. Соединение формулы (I) или его соль, сольват, гидрат или полиморф для применения по любому из предшествующих пунктов, причем в формуле (I)

$n = 1$;

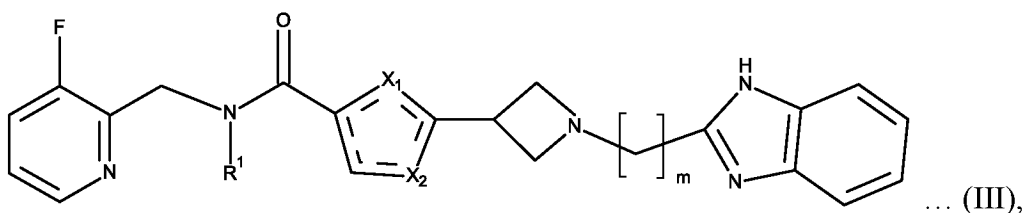
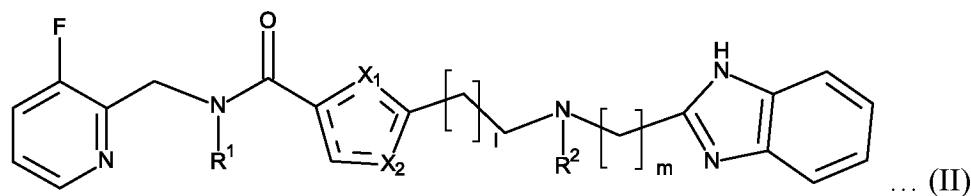
$R^3 =$ водород;

$R^4 =$ водород;

$A^1 =$ метилен или этан-1,2-диил;

$A^2 =$ метилен, этан-1,2-диил или пропан-1,3-диил;

или A^1 и R^2 , вместе с атомом азота, с которым они связаны, образуют необязательно замещенный 4-членный цикл, образуя соединения согласно формулам (II) или (III)



причем в формулах (II) и (III)

l равен 0 или 1;

m равен целому числу 1, 2 или 3, и

X^1 , X^2 и R^1 имеют значения, указанные в п. 1.

11. Соединение для применения по любому из предшествующих пунктов, которое находится в форме фармацевтически приемлемой соли с кислотой из группы, состоящей из бензойной кислоты, лимонной кислоты, фумаровой кислоты, хлороводородной

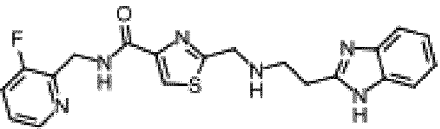
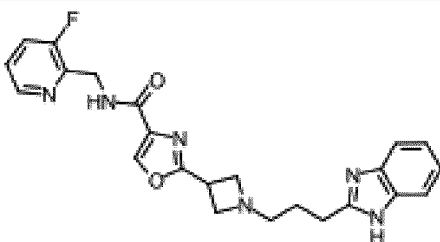
кислоты, молочной кислоты, яблочной кислоты, малеиновой кислоты, метансульфоновой кислоты, фосфорной кислоты, янтарной кислоты, серной кислоты, винной кислоты, и толуолсульфоновой кислоты,

предпочтительно с кислотой из группы, состоящей из лимонной кислоты, хлороводородной кислоты, малеиновой кислоты, фосфорной кислоты и серной кислоты;

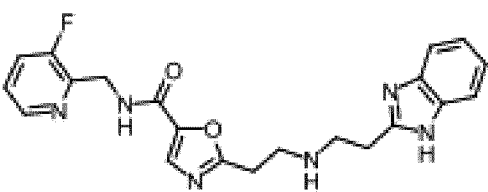
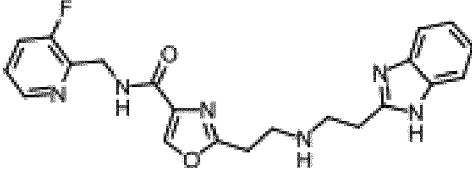
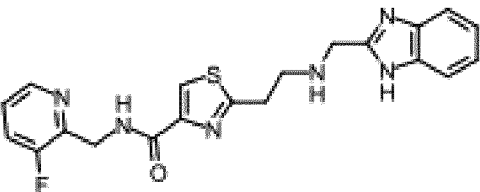
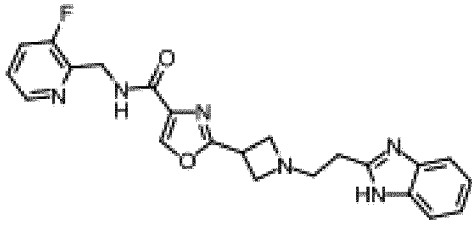
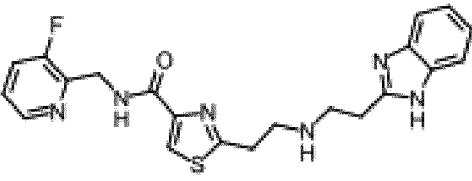
или его сольват, гидрат или полиморф.

12. Соединение для применения по любому из предшествующих пунктов, причем соединение формулы (I) выбрано из группы, состоящей из

Пр. №	Структура		Пр. №	Структура
1			126	
2			127	
4			193	
40			206	
94			208	

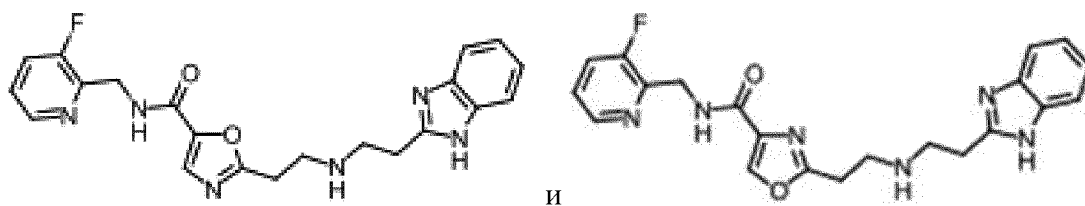
118		233	
-----	---	-----	--

предпочтительно соединение формулы (I) выбрано из группы, включающей

Пр. №	Структура	Пр. №	Структура
1		127	
40		208	
94			

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, гидрат или полиморф.

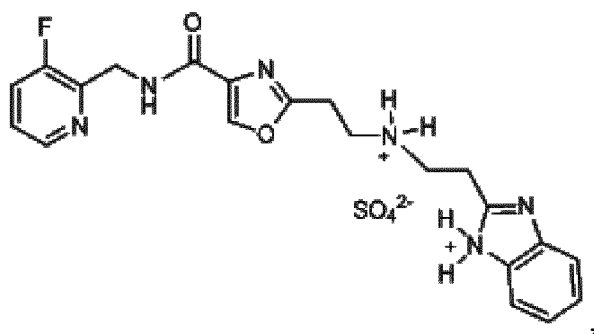
13. Соединение для применения по любому из предшествующих пунктов, причем соединение формулы (I) выбрано из группы, состоящей из



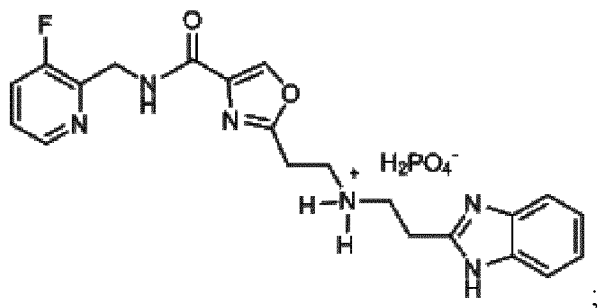
или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, гидрат или полиморф,

или из группы следующих солей:

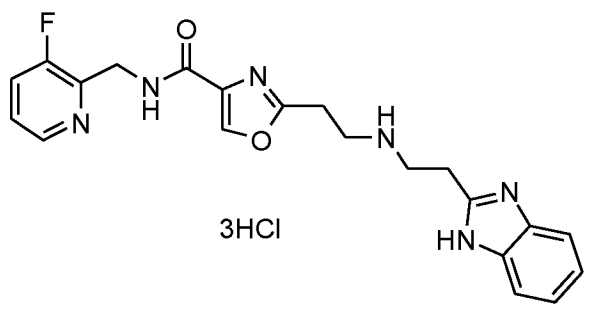
сульфат 1:1, имеющий формулу



фосфат 1:1, имеющий формулу



HCl-соль 1:3, имеющая формулу



и их полиморфы.

14. Лекарственное средство, содержащее одно или несколько соединений по любому из пп. 1 и 10-13 для применения по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащее один или несколько фармацевтически приемлемых носителей и/или вспомогательных веществ и/или растворителей и/или одно или несколько дополнительных фармацевтически активных соединений.

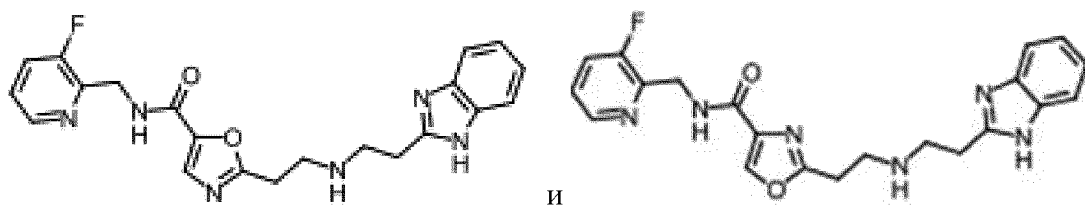
15. Соединение формулы (I) или его соль, сольват, гидрат или полиморф для применения в комбинированной терапии для лечения трансфузионно-зависимой β -талассемии по любому из предшествующих пунктов, причем комбинированная терапия включает совместное введение соединения по любому из предшествующих пунктов, включая соли, сольваты, гидраты и полиморфы, с одним или несколькими другими дополнительными фармацевтически активными соединениями,

где совместное введение при комбинированной терапии может осуществляться в комбинированной терапии в фиксированной дозе путем совместного введения соединения по любому из предшествующих пунктов, включая соли, сольваты, гидраты и полиморфы,

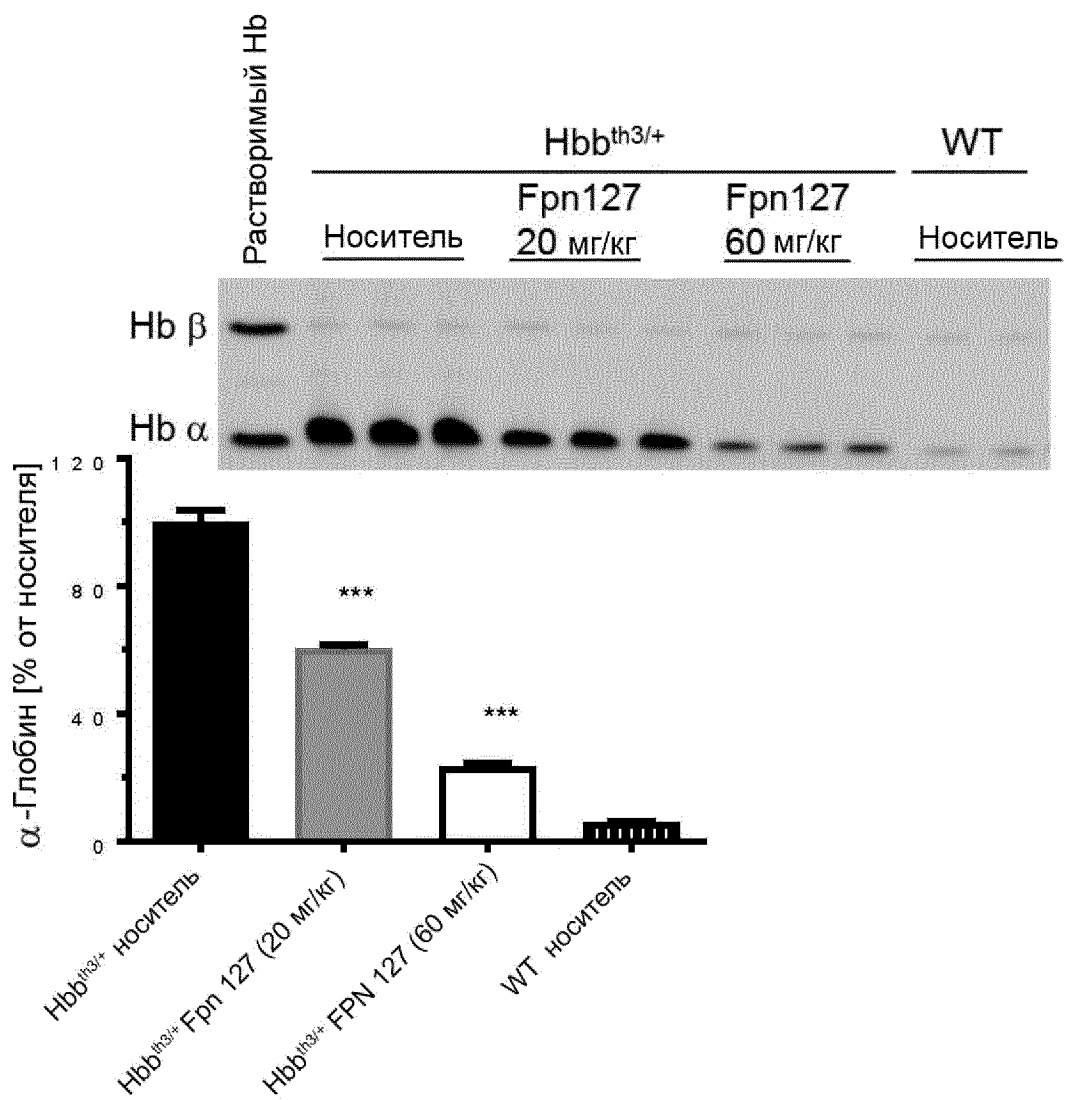
и одного или нескольких других дополнительных фармацевтически активных соединений в препарате в фиксированной дозе, или

где совместное введение при комбинированной терапии может осуществляться в комбинированной терапии в свободной дозе путем совместного введения соединения по любому из предшествующих пунктов, включая соли, сольваты, гидраты и полиморфы, и одного или нескольких других дополнительных фармацевтически активных соединений в свободных дозах соответствующих соединений либо путем одновременного введения отдельных соединений, либо путем последовательного применения отдельных соединений, распределенного по времени.

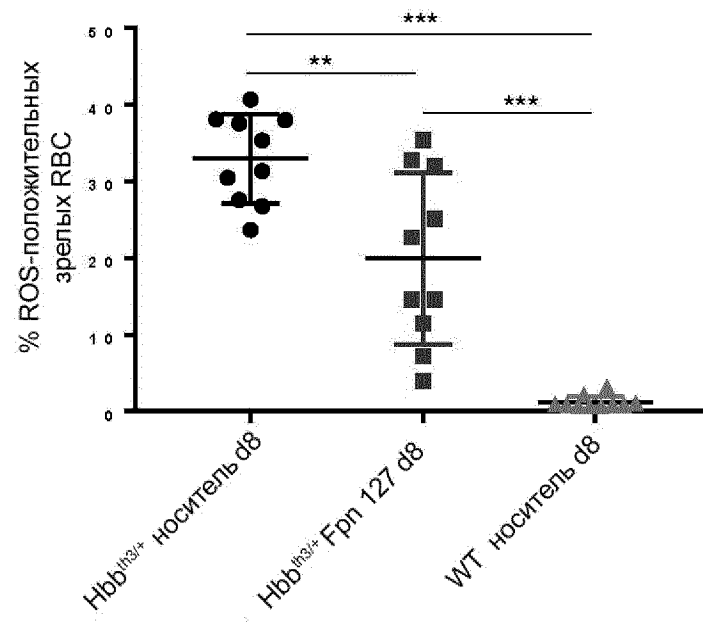
16. Соединение формулы (I) или его соль, сольват, гидрат или полиморф для применения в комбинированной терапии по п. 15, где соединение формулы (I) выбрано из группы, состоящей из



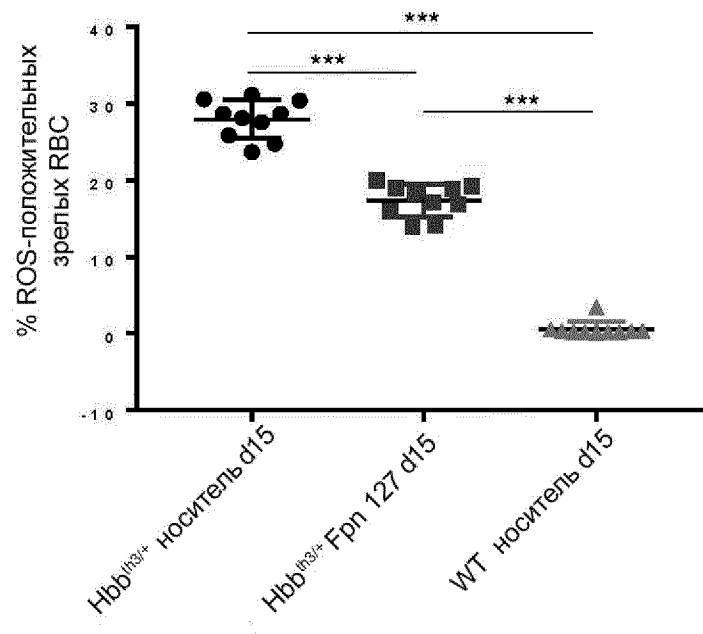
а дополнительное фармацевтически активное соединение представляет собой хелатор железа деферазирокс.



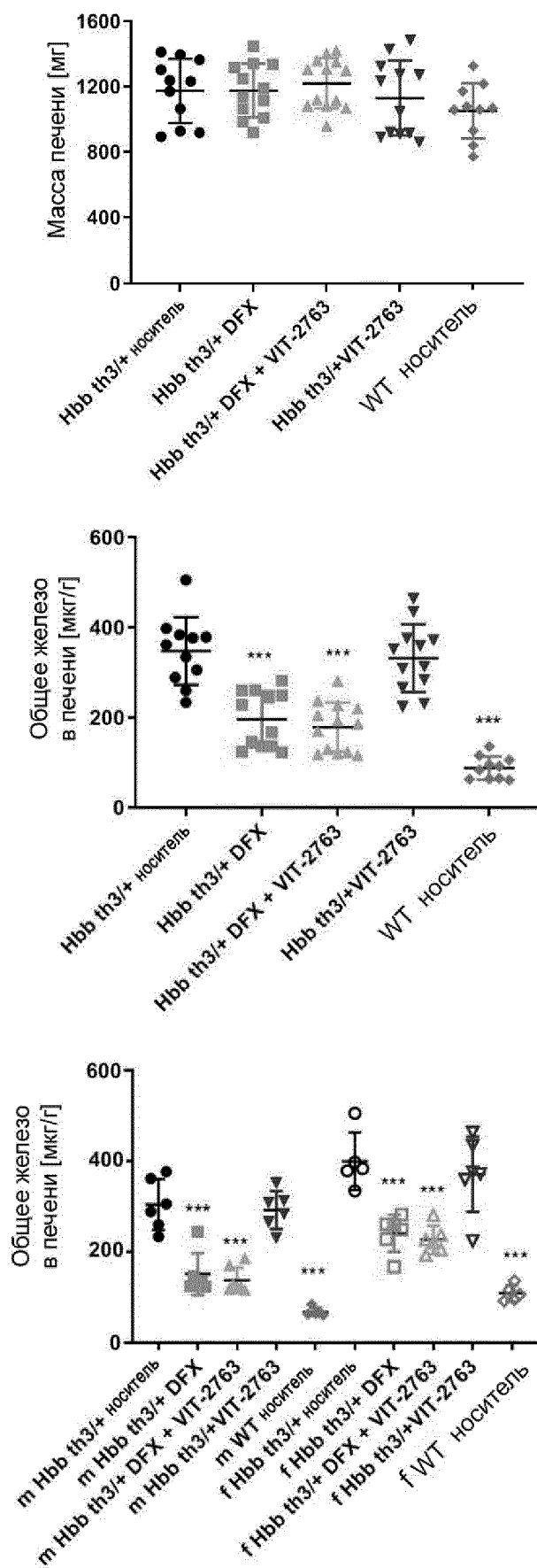
Фиг. 1



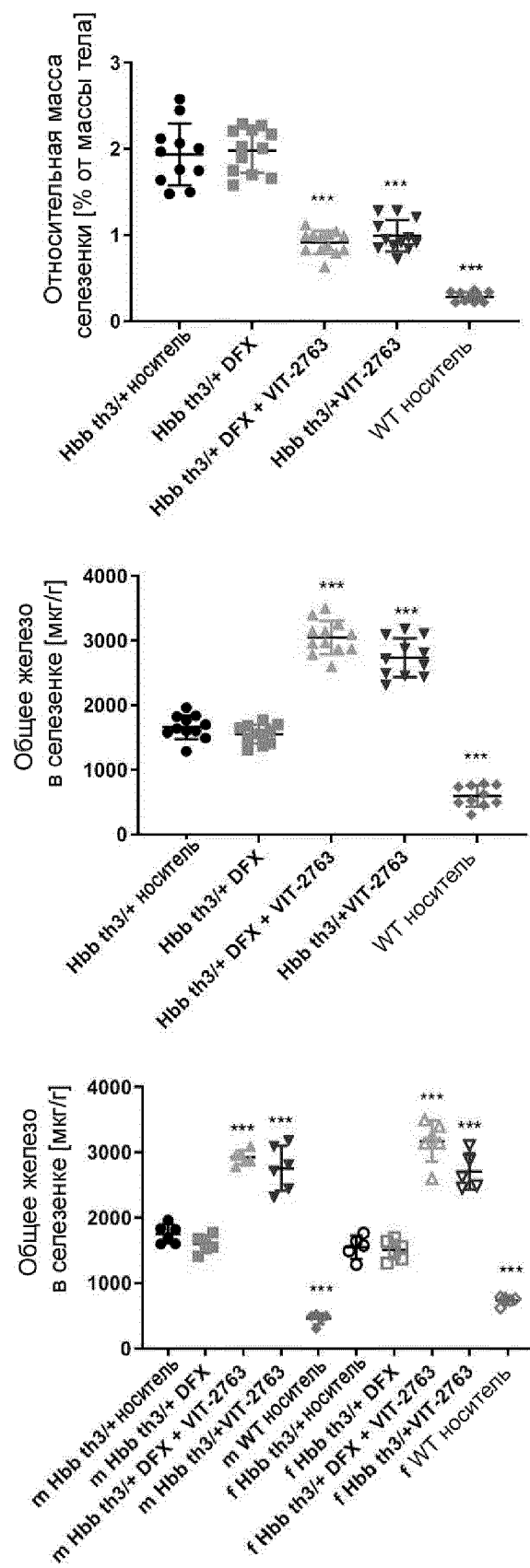
Фиг. 2А



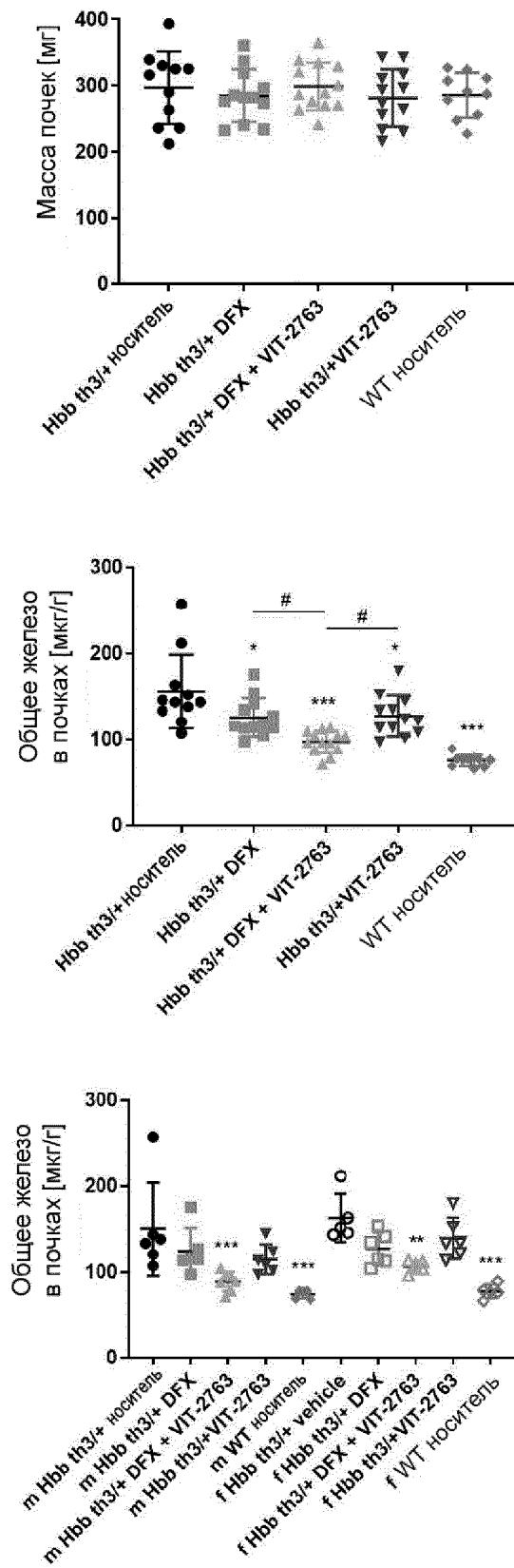
Фиг. 2В



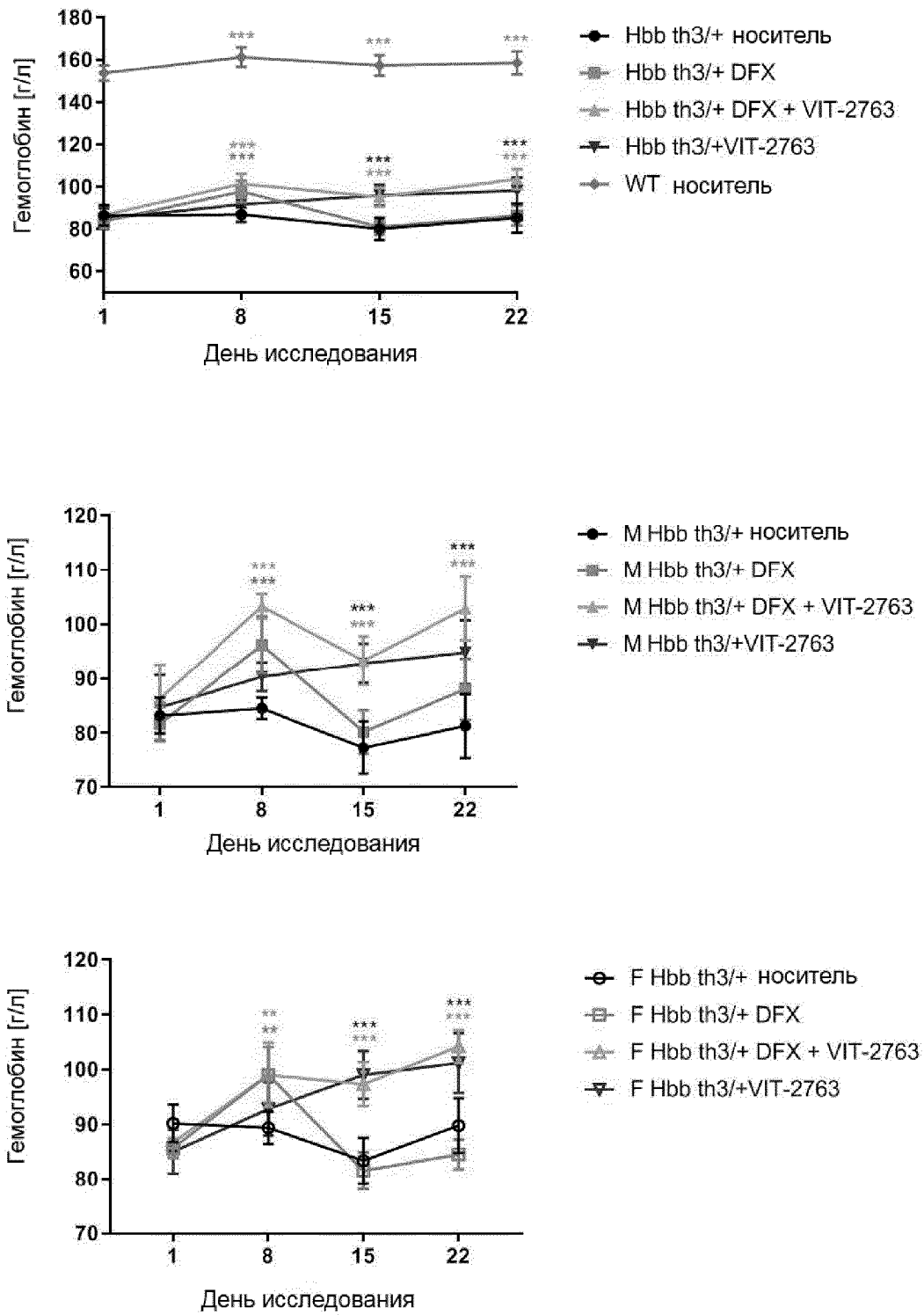
Фиг. 3



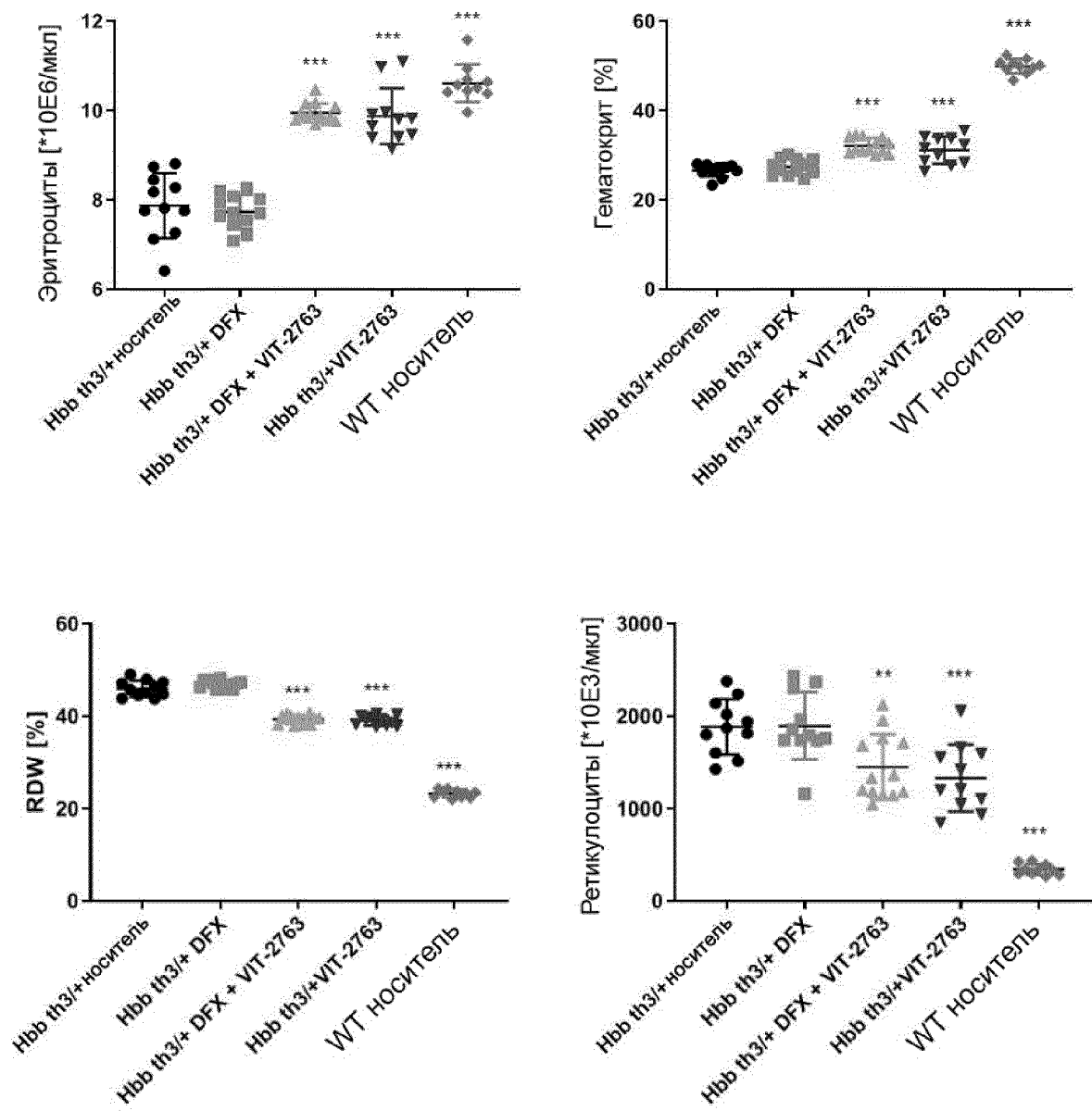
Фиг. 4



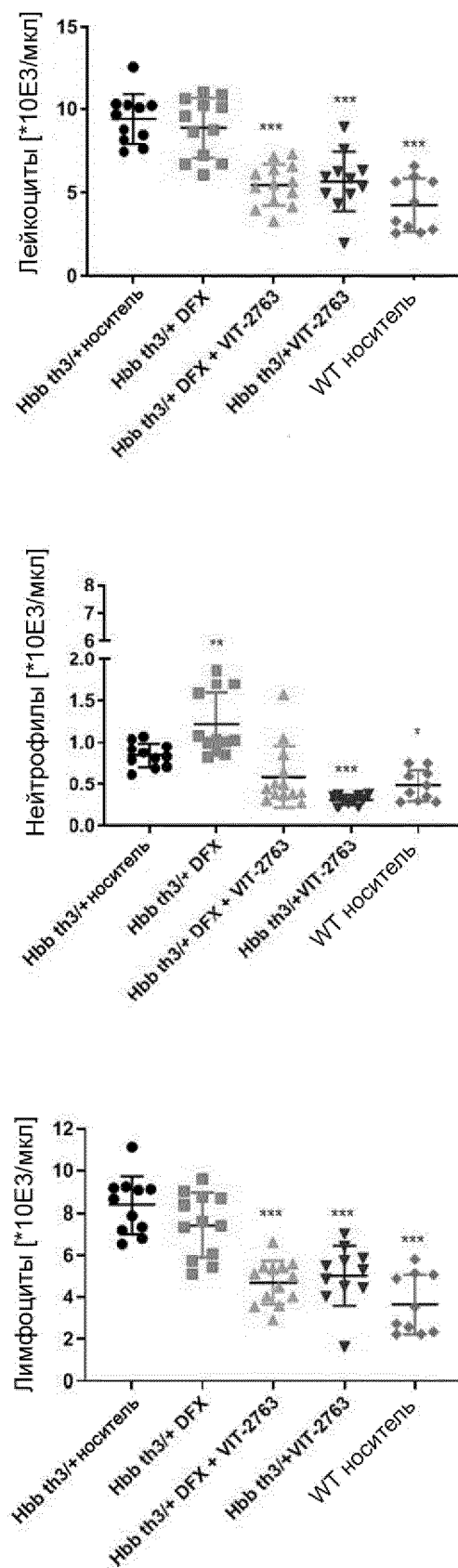
Фиг. 5



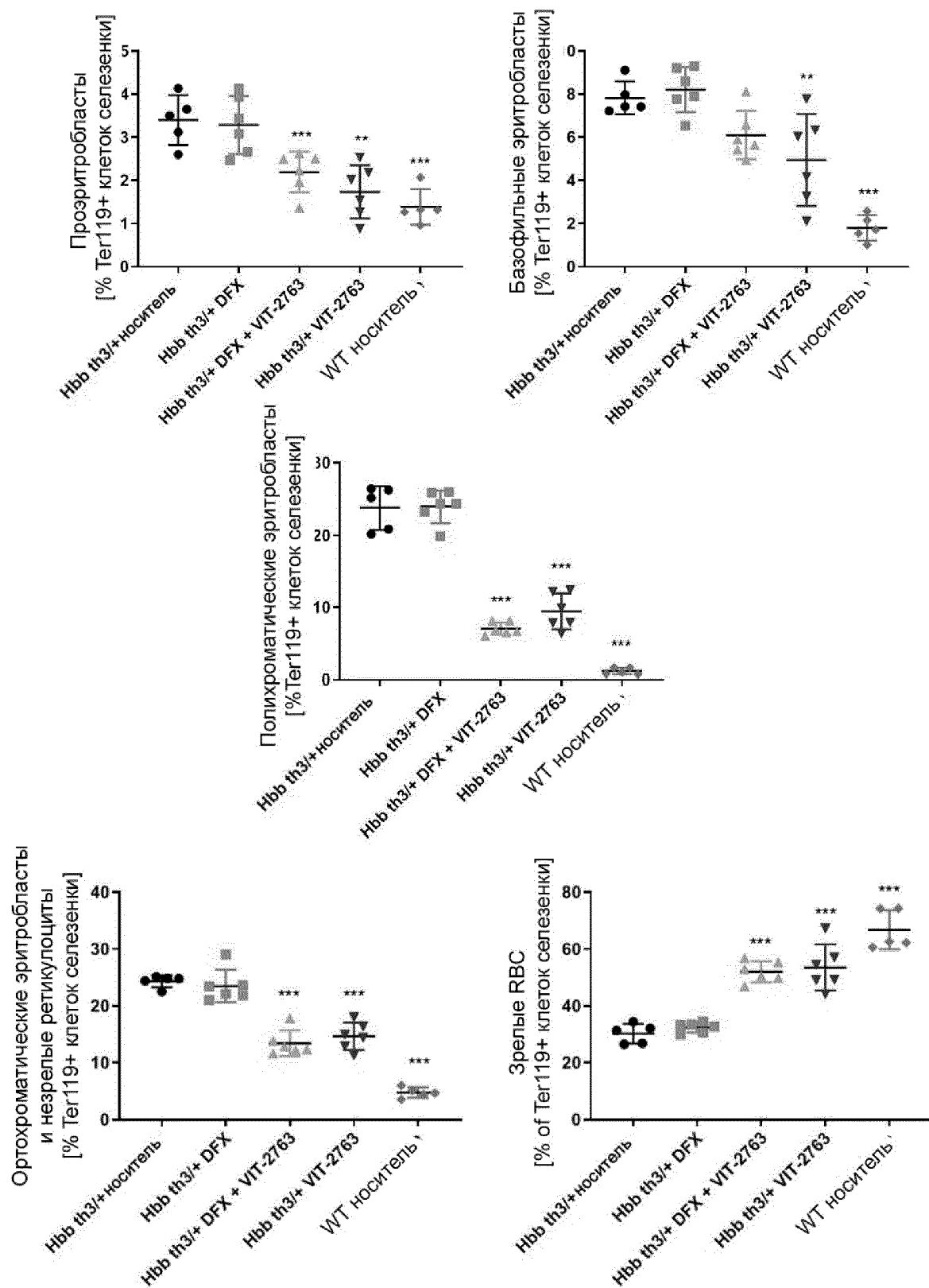
Фиг. 6



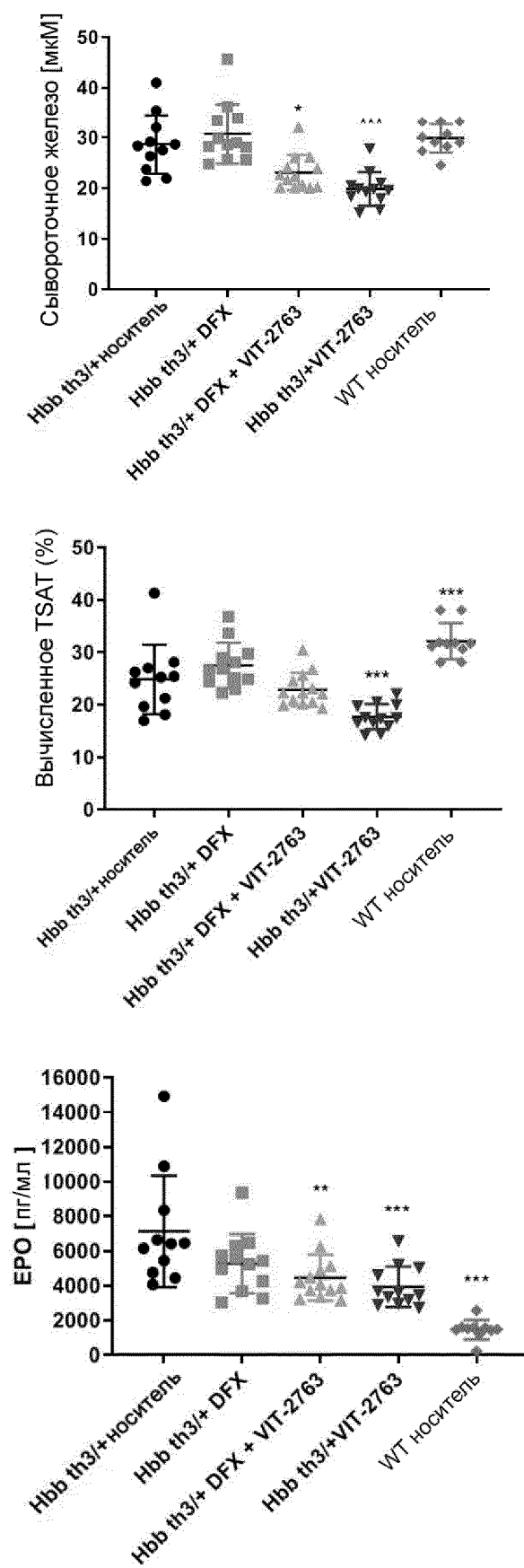
ФИГ. 7



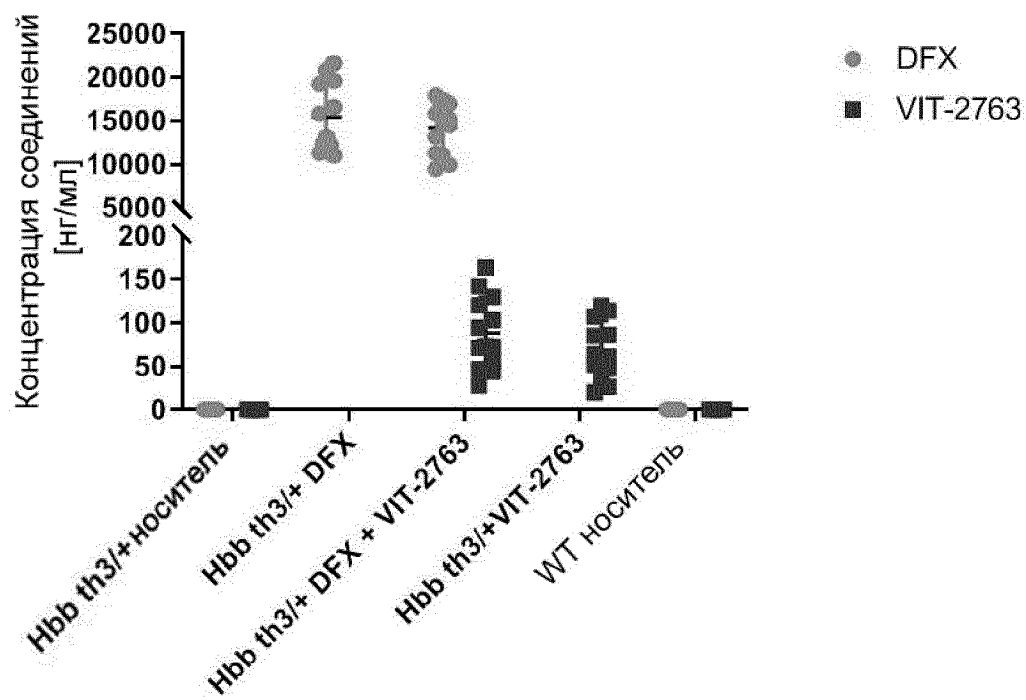
Фиг. 8



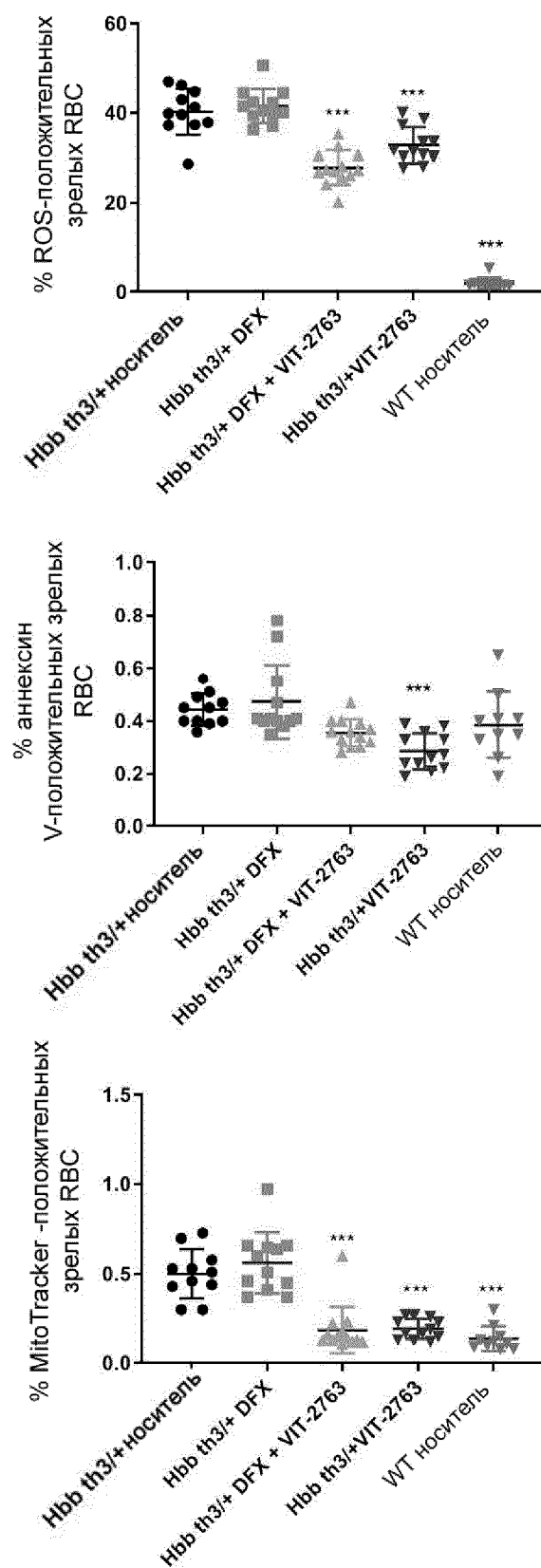
Фиг. 9



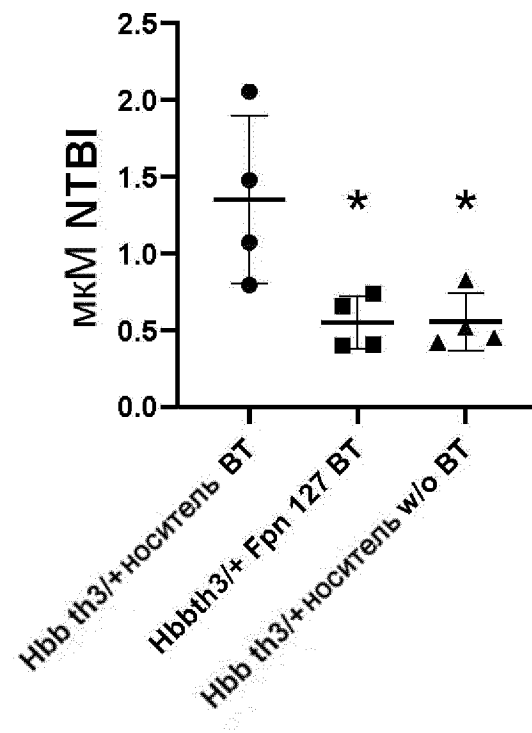
Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13